

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491302 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.09(22) Дата подачи заявки  
2022.12.01(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 47/10* (2017.01)  
*A61K 47/26* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)

## (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СОСТАВА, СОДЕРЖАЩЕГО АНТИТЕЛО

(31) 2021-195788

(32) 2021.12.01

(33) JP

(86) PCT/JP2022/044355

(87) WO 2023/100975 2023.06.08

(71) Заявитель:

ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ  
КАЙСЯ (JP); Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ  
РОШ АГ (CH)

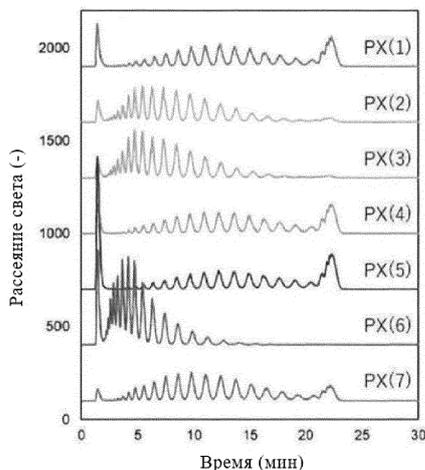
(72) Изобретатель:

Соеда Кохен, Фукуда Масаказу,  
Такахаша Масайя, Имаи Хиротака,  
Саито Сатоси (JP), Дюбёф Джереми,  
Равури Кишоре, Конф Роберт, Чен  
Вай, Олтра Нурия Санчо (CH)

(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 описан фармацевтический состав с уменьшенным образованием частиц, содержащий антитело к фактору свертывания крови IXa/X (биспецифическое моноклональное антитело), которое заменяет фактор свертывания крови VIII, или антитело к рецептору IL-6, которое ингибирует связывание с рецептором интерлейкина 6. Представлен фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (поллоксамер), где поллоксамер представлен формулой I:  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_c\text{H}$  (I), в которой a и c независимо означают целое число, выбранное из чисел 75-85; b представляет собой целое число, выбранное из чисел 22-33; и a, b и c означают средние значения по всему поллоксамеру, и поллоксамер включает молекулы поллоксамера, содержащие 34 или более  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) от общего количества поллоксамера.



A1

202491302

202491302

A1

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СОСТАВА, СОДЕРЖАЩЕГО АНТИТЕЛО

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к стабильному фармацевтическому составу, содержащему антитело.

Предшествующий уровень техники

10 В последние годы разработаны и внедрены в практику различные составы антител, однако в таких водных растворах из-за наличия антител существует проблема образования частиц. В качестве образующихся частиц известны агрегаты, сформированные из антител, в том числе невидимые невооруженным  
15 глазом частицы (ГВЧ), которые представляют собой мелкие частицы диаметром от 1,5 мкм до менее чем 50 мкм, которые обычно считают трудноразличимыми для глаз, и видимыми частицами (ВЧ, размером более 100 мкм), которые можно обнаружить визуально при стандартной освещенности (около 2000–3000 люкс). Полнота визуального обнаружения видимых частиц в фармацевтических  
20 составах сильно различается среди практикующих врачей, но сообщалось, что степень обнаружения частиц диаметром 100 мкм составляет около 40%, степень обнаружения частиц диаметром 150 мкм составляет около 70% и степень обнаружения частиц диаметром 200 мкм составляет почти 100% при стандартной освещенности (около 2000–3000 люкс), указанной в фармакопее (непатентная литература 1). Также можно визуально обнаружить частицы еще  
25 меньшего диаметра, размером всего 40 мкм, за счет увеличения освещенности, при которой осуществляют наблюдение, и длительности наблюдения.

Известно, что использование поверхностно-активных веществ уменьшает образование частиц. Примеры таких поверхностно-активных веществ включают  
30 неионогенные поверхностно-активные вещества, содержащие полоксамеры, такие как полоксамер 188 (PX188), и полисорбаты, такие как полисорбат 20 и полисорбат 80. Однако способность снижать образование частиц варьирует в зависимости от типа и марки поверхностно-активного вещества (непатентная литература 2-4 и патентная литература 1). Известно также, что даже у поверхностно-активных веществ одного типа структура содержащихся в них

полимеров неоднородна. Известно, что полоксамер 188 варьирует от партии к партии, поэтому изучают способы получения более гомогенного полоксамера 188 (непатентная литература 2 и патентная литература 2-5). Также сообщалось, что различия в гидрофобности, возникающие из-за гетерогенности  
5 поверхностно-активных веществ, могут влиять на образование частиц (непатентная литература 2).

#### СПИСОК ЦИТИРОВАНИЯ

##### ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

[Патентная литература 1] Японский перевод публикации международной  
10 заявки РСТ № 2020-534260

[Патентная литература 2] Японский перевод публикации международной заявки РСТ № 2017-523828

[Патентная литература 3] Японский перевод публикации международной заявки РСТ № 2019-511606

15 [Патентная литература 4] Японский перевод публикации международной заявки РСТ № 2009-508132

[Патентная литература 5] Японский перевод публикации международной заявки РСТ № 2014-502656

##### НЕПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

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

[Непатентная литература 2] Chen с соавт., *J. Chromatogr. A* 2021, 1652, 462353

25 [Непатентная литература 3] Grapentin с соавт., *J. Pharm. Sci.* 2020, 109, 2393-2404

[Непатентная литература 4] Vaclaw с соавт., *J. Pharm. Sci.* 2021, 110, 746-759.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

30 Ранее не было известно, какая степень гидрофобности поверхностно-активного вещества могла бы понизить образование частиц антител к фактору свертывания крови IXa/X (биспецифические моноклональные антитела), которые заменяют фактор свертывания крови VIII, или антител к рецептору IL-6, которые

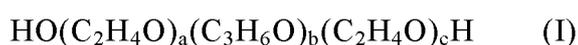
ингибируют связывание с рецептором интерлейкина 6. Кроме того, не было известно влияние поверхностного натяжения раствора, содержащего поверхностно-активное вещество и примеси, содержащиеся в поверхностно-активном веществе (например, непрореагировавшие промежуточные соединения с ненасыщенными связями), на образование частиц. Существует потребность в более качественных поверхностно-активных веществах для контроля образования частиц.

#### РЕШЕНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление поверхностно-активного вещества, такого как полуксамер, который содержит компоненты с длинными полипропиленоксидными блоками, которым свойственна высокая гидрофобность, эффективно снижает образование частиц в фармацевтических составах, содержащих специфические антитела. В частности, в настоящем описании приводят описание следующего изобретения.

[1-1] Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, а также полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (полуксамер),

где полуксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают целое число, выбранное из чисел от 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

a, b и c означают средние значения по всему полуксамеру,

и

площадь пика после времени элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

5 От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

10 От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[1-2] Фармацевтический состав по [1-1], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел от 22-33.

[1-3] Фармацевтический состав по [1-1], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел от 25-30.

[1-4] Фармацевтический состав по [1-1], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел от 35-40.

25 [1-5] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-4], где площадь пика через 17 минут составляет 6% или более, 19% или более, 33% или более или 35% или более.

[1-6] Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (полоксамер),

где полоксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают целое число, выбранное из чисел от 75-85;

5 b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и

площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика в высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

10

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

15

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

20

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

25

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки: 50 ± 25°C, уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

30

(6) Температура колонки: 65 ± 5°C

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[1-7] Фармацевтический состав по [1-6], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел 22-33.

[1-8] Фармацевтический состав по [1-6], где  $b$  представляет собой целое число, выбранное из чисел 25-30.

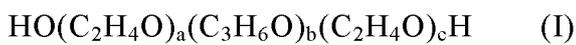
[1-9] Фармацевтический состав по [1-6], где  $b$  представляет собой целое число, выбранное из чисел 35-40.

5 [1-10] Фармацевтический состав по любому из [1-6]-[1-9], где площадь пика через 17 минут составляет 6% или более, 20% или более, 36% или более или 46% или более.

10 [1-11] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-10], где колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом, представляет собой колонку PLRP-S.

[1-12] Фармацевтический состав, содержащая водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5 и полиоксиэтилен-  
15 полиоксипропиленгликоль (полоксамер),

где полуксамер представлен формулой I:



в которой  $a$  и  $c$  независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

$b$  означает число, выбранное из чисел 22-40; и

20  $a$ ,  $b$  и  $c$  означают средние значения по всему полуксамеру,

и

полоксамер включает молекулы полуксамера, содержащие 34 или более  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в молекуле в количестве 3 мас% или более от общего количества полуксамера.

25 [1-13] Фармацевтический состав по пунктам [1-12], где  $b$  представляет собой целое число, выбранное из чисел 22-33.

[1-14] Фармацевтический состав по пунктам [1-12], где  $b$  представляет собой целое число, выбранное из чисел 25-30.

30 [1-15] Фармацевтический состав по пунктам [1-12], где  $b$  представляет собой целое число, выбранное из чисел 35-40.

[1-16] Фармацевтический состав по любому из [1-12]-[1-15], содержащая молекулы полуксамера, содержащие 34 или более  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в молекуле, в

количестве 6 мас.%, 20 мас. %, 29 мас.% или 36 мас.% или более от общего количества полоксамера.

[1-17] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-16], где  
5 среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в диапазоне от 7680-9510.

[1-18] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-17], где  
концентрация полоксамера в водном растворе составляет от 0,001 до 100 мг/мл,  
от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл.

[1-19] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-18], где  
10 концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

[1-20] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-19], где водный  
раствор содержит один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов,  
выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов,  
15 носителей, антиоксидантов, хелатирующих агентов, природных полимеров,  
синтетических полимеров, криопротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

[1-21] Фармацевтический состав по любому из [1-1]-[1-20], где полоксамер  
представляет собой полоксамер 188 или полоксамер 237.

[2-1] Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий  
20 моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID  
NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и  
L-цепь SEQ ID NO: 5, и поверхностно-активное вещество, где поверхностно-  
активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество, с  
которым водный раствор, содержащий поверхностно-активное вещество в  
25 концентрации 0,5 мг/мл, имеет поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее.

[2-2] Фармацевтический состав по [2-1], где поверхностно-активное  
вещество представляет собой поверхностно-активное вещество, с которым  
водный раствор, содержащий поверхностно-активное вещество в концентрации  
0,5 мг/мл, имеет поверхностное натяжение 52 мН/м или менее, 51 мН/м или  
30 меньше, 50,7 мН/м или меньше, 50,5 мН/м или меньше или 39 мН/м или меньше.

[2-3] Фармацевтический состав по [2-1] или [2-2], где поверхностно-  
активное вещество выбрано из полоксамера или сложного эфира жирной  
кислоты и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбата).

[2-4] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-3], где поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер, представленный формулой I по любому из [1-1]-[1-4] или [1-21].

5 [2-5] Фармацевтический состав по [2-3], где полоксамер представляет собой полоксамер 188 или полоксамер 237.

[2-6] Фармацевтический состав по [2-4] или [2-5], где среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в диапазоне от 7680-9510.

10 [2-7] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-6], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 60, полисорбата 65 или полисорбата 80.

[2-8] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-7], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20 или полисорбата 80.

15 [2-9] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-8], в котором поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

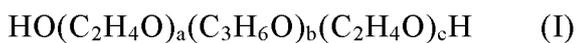
[2-10] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-9], где концентрация поверхностно-активного вещества в водном растворе составляет от 0,001 до 100 мг/мл, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл.

20 [2-11] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-10], где концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

25 [2-12] Фармацевтический состав по любому из [2-1]-[2-11], где водный раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов, носителей, антиоксидантов, хелатирующих агенты, природных полимеров, синтетических полимеров, крипротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

30 [3-1] Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (полоксамер),

где полоксамер представлен формулой I:



где а и с независимо представляют собой целое число, выбранное из чисел 75-85;

5        b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

а, b и с а – средние значения по всему полоксамеру,

и,

степень ненасыщенности полоксамера составляет менее 0,018 мЭкв/г.

10        [3-2] Фармацевтический состав по [3-1], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел 22-33.

[3-3] Фармацевтический состав по [3-1], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел 25-30.

[3-4] Фармацевтический состав по [3-1], где b представляет собой число, выбранное из чисел 35-40.

15        [3-5] Фармацевтический состав по любому из [3-1]-[3-4], где среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в диапазоне 7680-9510.

20        [3-6] Фармацевтический состав по любому из [3-1]-[3-5], где концентрация полоксамера в водном растворе составляет от 0,001 до 100 мг/мл, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл.

[3-7] Фармацевтический состав по любому из [3-1]-[3-6], где концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

25        [3-8] Фармацевтический состав по любому из [3-1]-[3-7], где водный раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов, носителей, антиоксидантов, хелатирующих агентов, природных полимеров, синтетических полимеров, криопротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

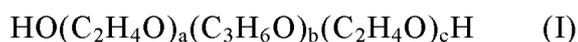
30        [3-9] Фармацевтический состав по любому из [3-1]-[3-8], где полоксамер представляет собой полоксамер 188 или полоксамер 237.

[4-1] Способ уменьшения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное

из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

5 включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (полоксамера) в водный раствор,

где полоксамер представлен формулой I:



где a и c независимо представляют собой число, выбранное из чисел 75-85;

b представляет собой целое число, выбранное из чисел от 22-40; и

10 a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и

площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика в высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

15 [Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

20 Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

25 От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

30 (5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки: 50 ± 25°C, уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

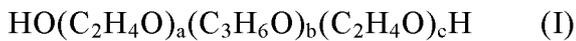
(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[4-2] Способ уменьшения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (полоксамера) в водный раствор,

где полоксамер представлен формулой I:



где a и c независимо представляют целое число, выбранное из чисел от 75 до 85;

b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика в высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

5 (6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

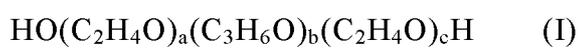
(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[4-3] Способ по [4-1]-[4-2], где колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом, представляет собой колонку PLRP-S.

10 [4-4] Способ снижения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

15 включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (полоксамера) в водный раствор,

где полоксамер представлен формулой I:



где a и c независимо представляют собой число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел от 22-40; и

20 a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и полоксамер включает молекулы полоксамера, содержащие 34 или более ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

25 [4-5] Способ по любому из [4-1]-[4-4], где b представляет собой число, выбранное из 22-33.

[4-6] Способ по любому из [4-1]-[4-4], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел 25-30.

[4-7] Способ по любому из [4-1]-[4-4], где b представляет собой целое число, выбранное из чисел 35-40.

30 [4-8] Способ по любому из [4-1]-[4-7], где полоксамер представляет собой полоксамер 188 или полоксамер 237.

[4-9] Способ уменьшения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное

из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

5 включающий добавление в водный раствор поверхностно-активного вещества, имеющего поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее в водном растворе поверхностно-активного вещества в концентрации 0,5 мг/мл.

[4-10] Способ по [4-9], где поверхностно-активное вещество выбрано из полуксамера или сложного эфира жирной кислоты и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбата).

10 [4-11] Способ по [4-9] или [4-10], где поверхностно-активное вещество представляет собой полуксамер, представленный формулой I в соответствии с любым из [1-1]-[1-4] или [1-21].

[4-12] Способ по [4-11], где среднечисленная молекулярная масса полуксамера находится в диапазоне 7680-9510.

15 [4-13] Способ по любому из [4-9]-[4-12], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 60, полисорбата 65 или полисорбата 80.

20 [4-14] Способ по любому из [4-9]-[4-13], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20 или полисорбата 80.

[4-15] Способ по любому из [4-9]-[4-14], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

25 [4-16] Способ по любому из [4-1]-[4-15], где поверхностно-активное вещество добавляют в концентрации от 0,001 до 100 мг/мл, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл в водном растворе.

[4-17] Способ по любому из [4-1]-[4-16], где концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

30 [4-18] Способ по любому из [4-1]-[4-17], где водный раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов, носителей, антиоксидантов, хелатирующих агентов, природных полимеров, синтетических полимеров, криопротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

[4-19] Способ по любому из [4-1]-[4-18], где частица образована из белка.

[4-20] Способ по любому из [4-1]-[4-19], где частица имеет диаметр 40 мкм или более.

[5-1] Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий  
5 моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID  
NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и  
L-цепь SEQ ID NO: 5, а также полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль  
(полоксамер),

где среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в  
10 диапазоне 7680-9510.

[5-2] Фармацевтический состав по [5-1],

где полоксамер представлен формулой I:



где a и c независимо представляют целое число, выбранное из чисел от 60-  
15 85;

b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру.

[5-3] Фармацевтический состав по [5-2], где a и c независимо представляют  
с собой число, выбранное из чисел 60-68.

[5-4] Фармацевтический состав по [5-3], где b представляет собой число,  
20 выбранное из чисел 22-33.

[5-5] Фармацевтический состав по [5-3], где b представляет собой число,  
выбранное из чисел 25-30.

[5-6] Фармацевтический состав по [5-3], где b представляет собой целое  
25 число, выбранное из чисел 35-40.

[5-7] Фармацевтический состав по [5-2], где a и c независимо представляют  
с собой число, выбранное из чисел 75-85.

[5-8] Фармацевтический состав по [5-7], где b представляет собой число,  
выбранное из чисел 22-33.

[5-9] Фармацевтический состав по [5-7], где b представляет собой число,  
30 выбранное из чисел 25-30.

[5-10] Фармацевтический состав по [5-7], где b представляет собой число,  
выбранное из чисел 35-40.

[5-11] Фармацевтический состав по [5-2], где а и с независимо представляют собой число, выбранное из чисел 75-85, и b представляет собой число, выбранное из чисел 25-30.

5 [5-12] Фармацевтический состав по [5-2], где а и с независимо представляют собой число, выбранное из чисел 60-68, а b представляет собой число, выбранное из чисел 35-40.

10 [5-13] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-12], где площадь пика после 17-минутного элюирования составляет 3% или более от общей площади пика через 1,5 минуты проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

15 Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

20 От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

25 (4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

30 (6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[5-14] Фармацевтический состав по [5-13], где площадь пика после 17-минутного элюирования составляет 3% или более от общей площади пика при проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии.

5 [5-15] Фармацевтический состав по [5-13] или [5-14], где площадь пика через 17 минут составляет 6% или более, 19% или более, 20% или более, 33% или более, 35% или более, 36% или более или 46% или более.

[5-16] Фармацевтический состав по любому из [5-13]-[5-15], где колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом, представляет собой колонку PLRP-S.

10 [5-17] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-16], где полоксамер содержит молекулы полоксамера, содержащие 34 или более ( $C_3H_6O$ ) в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

[5-18] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-17], где полоксамер содержит молекулы полоксамера, содержащие 34 или более ( $C_3H_6O$ ) в молекуле  
15 в количестве 6%, 20%, 29% или 36% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

[5-19] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-18], где степень ненасыщенности полоксамера составляет менее 0,018 мЭкв/г.

[5-20] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-19], где  
20 среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в диапазоне 6840-8830.

[5-21] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-20], где концентрация полоксамера в водном растворе составляет от 0,001 до 100 мг/мл, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл в водном растворе.

25 [5-22] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-21], где концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

[5-23] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-22], где водный раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых  
30 эксципиентов, выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов, носителей, антиоксидантов, хелатирующих агентов, природных полимеров, синтетических полимеров, криопротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

[5-24] Фармацевтический состав по любому из [5-1]-[5-23], где полуксамер представляет собой полуксамер 188 или полуксамер 237.

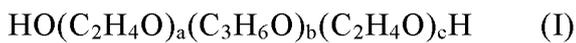
[6-1] Способ снижения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (полуксамера) в водный раствор,

где среднечисленная молекулярная масса полуксамера находится в диапазоне 7680-9510.

[6-2] Способ по [6-1],

где полуксамер представлен формулой I:



где a и c независимо означают целое число, выбранное из чисел 60-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-40; и

a, b и c – средние значения по всему полуксамеру.

[6-3] Способ по [6-2], где a и c независимо означают число, выбранное из чисел 60-68.

[6-4] Способ по [6-3], где b означает число, выбранное из чисел 22-33.

[6-5] Способ по [6-3], где b означает число, выбранное из чисел 25-30.

[6-6] Способ по [6-3], где b означает число, выбранное из чисел 35-40.

[6-7] Способ по [6-2], где a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85.

[6-8] Способ по [6-7], где b означает целое число, выбранное из чисел 22-33.

[6-9] Способ по [6-7], где b означает целое число, выбранное из чисел 25-30.

[6-10] Способ по [6-7], где b означает целое число, выбранное из чисел 35-40.

[6-11] Способ по [6-2], где a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85, и b означает число, выбранное из чисел 25-30.

[6-12] Способ по [6-2], где *a* и *c* независимо означают число, выбранное из чисел 60-68, и *b* означает целое число, выбранное из чисел 35-40.

[6-13] Способ по любому из [6-1]-[6-12], где площадь пика после 17-минутного элюирования составляет 3% или более от общей площади пика через 1,5 минуты проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

10 (2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

15 От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

20 От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин.

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

[6-14] Способ по [6-13], где площадь пика после 17-минутного элюирования составляет 3% или более от общей площади пика при проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[6-15] Способ по [6-13] или [6-14], где площадь пика через 17 минут составляет 6% или более, 19% или более, 20% или более, 33% или более, 35% или более, 36% или более или 46% или более.

[6-16] Способ по любому из [6-13]-[6-15], где колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом, представляет собой колонку PLRP-S.

5 [6-17] Способ по любому из [6-1]-[6-16], где полоксамер содержит молекулы полоксамера, содержащие 34 или более ( $C_3H_6O$ ) в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

[6-18] Способ по любому из [6-1]-[6-17], где полоксамер содержит молекулы полоксамера, содержащие 34 или более ( $C_3H_6O$ ) в молекуле в количестве 6%, 20%, 29% или 36% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

10 [6-19] Способ по любому из [6-1]-[6-18], где степень ненасыщенности полоксамера составляет менее 0,018 мЭкв/г.

[6-20] Способ по любому из [6-1]-[6-19], где среднечисленная молекулярная масса полоксамера находится в диапазоне 6840-8830.

15 [6-21] Способ по любому из [6-1]-[6-20], где полоксамер представляет собой полоксамер 188 или полоксамер 237.

20 [6-22] Способ снижения образования частиц в водном растворе в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

включающий добавление в водный раствор поверхностно-активного вещества, имеющего поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее в водном растворе поверхностно-активного вещества в концентрации 0,5 мг/мл.

25 [6-23] Способ по [6-22], где поверхностно-активное вещество выбрано из полоксамера или сложного эфира жирной кислоты и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбата).

[6-24] Способ по [6-22] или [6-23], где поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер, представленный формулой I согласно любому из [6-2]-[6-12] или [6-21].

30 [6-25] Способ по любому из [6-22]-[6-24], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20, полисорбата 60, полисорбата 65 или полисорбата 80.

[6-26] Способ по любому из [6-22]-[6-25], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат, выбранный из полисорбата 20 или полисорбата 80.

5 [6-27] Способ по любому из [6-22]-[6-25], где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

[6-28] Способ по любому из [6-1]-[6-27], где поверхностно-активное вещество добавляют в концентрации от 0,001 до 100 мг/мл, от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл или от 0,1 до 1 мг/мл в водный раствор.

10 [6-29] Способ по любому из [6-1]-[6-28], где концентрация антитела в водном растворе составляет от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

[6-30] Способ по любому из [6-1]-[6-29], где водный раствор содержит один или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, выбранных из сахаров, сахарных спиртов, буферных агентов, консервантов, носителей, антиоксидантов, хелатирующих агентов, природных полимеров, синтетических полимеров, крипротекторов, наполнителей и стабилизаторов.

[6-31] Способ по любому из [6-1]-[6-30], где частица образуется из белка.

[6-32] Способ по любому из [6-1]-[6-31], где диаметр частицы составляет 40 мкм и более.

## 20 ПОЛЬЗА ОТ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному из объектов настоящего изобретения предусматривают фармацевтический состав с пониженным образованием частиц, включающий водный раствор, содержащий антитело к фактору свертывания крови IXa/X (биспецифическое моноклональное антитело), которое заменяет фактор свертывания крови VIII, или антитело к рецептору IL-6, которое ингибирует связывание с рецептором интерлейкина 6, и поверхностно-активное вещество.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1. Хроматограмма, показывающая результаты анализа компонентов семи типов PX188 методом обращенно-фазовой хроматографии.

30 Фигура 2. График, показывающий результаты измерения значений поверхностного натяжения семи типов PX188 и одного типа PS80.

Фигура 3. График, показывающий корреляцию между соотношением (%) поздних элюатов в компонентах, содержащихся в РХ188, и значениями поверхностного натяжения.

5 Фигура 4. Действия по механическому напряжению (включая один или четыре набора вибрационных напряжений).

Фигура 5. Действия по приложению механического напряжения.

Фигура 6. Раман-спектры типичной частицы, состоящей только из белка, и частицы, состоящей из комплекса белка и полидиметилсилоксана (ПДМС) (белок-ПДМС).

10 Фигура 7. График, показывающий корреляцию между соотношением поздних элюатов РХ188 и степенью образования частиц в условиях теплового стресса для mAb1.

15 Фигура 8. График корреляции между соотношением поздних элюатов РХ188 и степенью образования визуально обнаруживаемых частиц в условиях теплового стресса для mAb2.

Фигура 9. График, показывающий корреляцию между степенью образования визуально обнаруживаемых частиц в условиях механического напряжения для mAb1 и соотношением (%) поздних элюатов, ненасыщенности и синтетических переменных РХ188, соответственно.

20 Фигура 10. График корреляции между степенью образования визуально обнаруживаемых частиц в условиях механического напряжения для mAb2 и соотношением поздних элюатов, ненасыщенности и синтетических переменных РХ188, соответственно.

25 Фигура 11. Изображение защиты антител путем адсорбции РХ188 на границе раздела фаз.

Фигура 12. График значений поверхностного натяжения РХ188.

Фигура 13. Результаты компонентного анализа РХ237 методом обращенно-фазовой хроматографии.

30 Фигура 14. График результатов измерения значений поверхностного натяжения РХ237.

## ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 1. Антитело

В настоящем описании термин «антитело» используют в самом широком  
5 смысле, и он охватывает различные структуры антител, включая, помимо  
прочего, моноклональное антитело, поликлональное антитело,  
мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) и  
фрагмент антитела, при условии, что антитело проявляет желаемую  
антигенсвязывающую активность.

10 Понятие «класс» применительно к антителу относится к типу константного  
домена или константной области, локализованной в тяжелой цепи антитела.  
Антитела относятся к 5 основным классам: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые  
из этих классов могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы).  
Примерами являются IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены  
15 тяжелой цепи, соответствующие иммуноглобулинам разных классов, называют  
 $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.

Термин «моноклональное антитело» в настоящем описании относится к  
антителу, полученному из в существенной степени однородной популяции  
антител. То есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны  
20 и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением мутантных  
антител, которые могут возникнуть (например, мутантных антител, содержащих  
естественные мутации, или мутантных антител, которые возникают в процессе  
производства препаратов моноклональных антител. Такие мутанты обычно  
присутствуют в небольших количествах.). В отличие от препаратов  
25 поликлональных антител, которые обычно содержат различные антитела к  
различным детерминантам (эпитопам), каждое моноклональное антитело  
препарата моноклональных антител относится к единственной детерминанте  
антигена. Поэтому определение «моноклональный» указывает на характеристику  
антитела как полученного из существенно однородной популяции антител, и не  
30 должно толковаться как требующее производства антитела каким-либо  
определенным методом. Например, моноклональное антитело, используемое в  
соответствии с настоящим изобретением, может быть получено различными  
методами, включая, помимо прочего, методы гибридом, методы рекомбинантной

ДНК, методы фагового дисплея и методы, использующие трансгенных животных, содержащих все или некоторые локусы иммуноглобулина человека, а также такие методы и примеры других методов получения моноклональных антител, которые описаны в настоящем изобретении.

5 В настоящем описании термин «Fc-область» используют для определения C-концевой области тяжелых цепей иммуноглобулина, включая по крайней мере часть константных областей. Этот термин включает Fc-область с естественной последовательностью и мутантную Fc-область.

10 Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой цепи или легкой цепи антитела, домену, который участвует в обеспечении связывания антитела с антигеном. Обычно вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) природного антитела структурно схожи и каждый из них содержат 4 консервативных каркасных области (FR) и 3 гипервариабельных области (HVR) (см., например, Kindt с соавт., *Kuby Immunology*, 6-е изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, стр. 91).  
15 Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитело, связывающееся с определенным антигеном, может быть выделено с использованием домена VH или VL из антитела, связывающегося с антигеном, посредством скрининга  
20 библиотеки, комплементарной домену VL или VH. Например, см. Portolano с соавт., *J. Immunol.* 1993, 150:880-887; Clarkson с соавт., *Nature* 1991, 352:624-628.

Термин «каркас» или «FR» относится к остаткам вариабельного домена, за исключением остатков гипервариабельной области (HVR). FR в вариабельном домене обычно состоит из четырех доменов FR: FR1, FR2, FR3 и FR4. В  
25 соответствии с этой последовательности HVR и FR обычно появляются в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Термин «гипервариабельная область» или «HVR», используемый в настоящем изобретении, относится к области в вариабельном домене антитела, которая является гипервариабельной по своей последовательности («CDR»  
30 (область, определяющая комплементарность)), и/или образует петлю с установленной структурой («гипервариабельная петля»), и/или содержит остатки, контактирующие с антигеном («антигенные контакты»). Обычно

антитело состоит из шести HVR: три HVR (H1, H2 и H3) в VH и три HVR (L1, L2 и L3) в VL.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое специфически связывается с (а) фактором свертывания крови IX (FIX) и/или активированным фактором свертывания крови IX (FIXa) и (б) фактором свертывания крови X (FX) и/или активированным фактором свертывания крови FX (FXa) и имитирует функцию кофактора фактора свертывания крови VIII (FVIII) (например, эмицизумаб), или антитело к рецептору IL-6, которое ингибирует связывание с рецептором интерлейкина 6 (например, сатрализумаб (SA237)).

Эмицизумаб представляет собой биспецифическое антитело, имеющее H-цепи с последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь с последовательностью SEQ ID NO: 3.

Антитело к рецептору IL-6, используемое в настоящем изобретении, связывается с рецептором IL-6, тем самым ингибируя связывание IL-6 с рецептором IL-6 и, таким образом, блокируя передачу биологической активности IL-6 в клетку. Примеры такого антитела к рецептору IL-6 включают моноклональное антитело, имеющее H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5 (сатрализумаб (SA237)).

Согласно одному из объектов настоящего изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело, в том числе химерное, гуманизированное или антитело человека. В одном из вариантов антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагменты Fv, Fab, Fab', scFv, диатело или F(ab')<sub>2</sub>. В другом режиме антитело представляет собой полноразмерное антитело, такое как полноразмерные антитела IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 или антитела других классов или изотипов, представленные в настоящем описании.

Согласно одному из объектов настоящего изобретения к используемому моноклональному антителу относятся не только моноклональные антитела, полученные от животных, таких как люди, мыши, крысы, хомяки, кролики, овцы, верблюды и обезьяны, но также и искусственно измененные генные рекомбинантные антитела, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела и биспецифические антитела. Кроме того, сюда также относятся генно-

рекомбинантные антитела, в которых константная область или подобная область антитела искусственно изменена для изменения физических свойств молекулы антитела (в частности, для изменения изоэлектрической точки (pI), сродства с Fc-рецептором и т.д.) с целью улучшения удержания в крови и кинетики *in vivo*.

5 В одном объекте настоящего изобретения используемое антитело может быть получено известным методом. Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, могут быть в основном получены с использованием известных методов следующим образом. То есть, желаемый антиген или клетка, экспрессирующая желаемый антиген, используют в качестве

10 сенсibiliзирующего антигена для иммунизации клеток в соответствии с обычным методом иммунизации. Полученные иммунизированные клетки сливаются с известными родительскими клетками с помощью обычного метода слияния клеток. Затем клетки, продуцирующие моноклональные антитела (гибридомы) подвергают скринингу обычным методом скрининга для получения

15 гибридом. Гибридомы могут быть получены в соответствии, например, с методом Milstein с соавт. (Kohler G., Milstein C., *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46). Когда иммуногенность антигена низкая, антиген может быть конъюгирован с макромолекулой, обладающей иммуногенностью, такой как молекула альбумина, для иммунизации.

20 Кроме того, могут быть использованы генно-рекомбинантные антитела, полученные путем клонирования генов антител из гибридом, включения их в соответствующие векторы, введения их хозяевам и использования метода генетической рекомбинации (см., например, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, под ред. Carl A.K. Borrebaeck, James W. Larrick, опубликовано в

25 Великобритании изд. MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). В частности, кДНК вариабельной области (V-области) антитела синтезируется из мРНК гибридомы с использованием обратной транскриптазы. После получения ДНК, кодирующей V-область целевого антитела, ее связывают с ДНК, кодирующей константную область (C-область) целевого антитела, и включают в вектор

30 экспрессии. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующая V-область антитела, может быть включена в вектор экспрессии, содержащий ДНК C-области антитела. ДНК встраивается в вектор экспрессии для экспрессии под контролем области контроля экспрессии, например, энхансера или промотора. Этот вектор

экспрессии может быть использован для трансформации клетки-хозяина для экспрессии антитела.

В одном объекте настоящего изобретения может быть использовано генно-рекомбинантное антитело, которое было искусственно изменено для снижения гетероантигенности против человека или тому подобного, например, химерное антитело или гуманизированное антитело. Такие измененные антитела могут быть получены с использованием известного метода. Химерное антитело представляет собой антитело, состоящее из переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела млекопитающего (не человека), например, мышинного антитела, и константной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека. Химерное антитело можно получить путем связывания ДНК, кодирующей переменную область антитела мыши, с ДНК, кодирующей константную область антитела человека, интеграции полученного продукта в вектор экспрессии и введения полученного вектора в организм хозяина для получения химерного антитела.

Гуманизированные антитела, также называемые реконструированными антителами человека, являются антителами млекопитающих (не человека), например, антителами мыши, в которых область определения комплементарности (CDR) привита к области определения комплементарности антитела человека; известны общие подходы к рекомбинации генов. В частности, последовательность ДНК, предназначенная для связывания CDR антитела мыши с каркасной областью (FR) антитела человека, синтезируется с помощью PCR из нескольких олигонуклеотидов, подготовленных таким образом, чтобы иметь перекрывающиеся части на концах. Полученную ДНК связывают с ДНК, кодирующей константную область антитела человека, затем включают в вектор экспрессии и вводят хозяину для получения гуманизированного антитела. (См. European Patent Application Publication No. 239400 и WO 96/02576). В качестве FR антитела человека, связанного через CDR, выбирают FR, чья область определения комплементарности образует хороший сайт связывания антигена. При необходимости аминокислоты в каркасной области переменной области антитела могут быть заменены так, чтобы область определения комплементарности реконструированного антитела

человека образовывала подходящий сайт для связывания антигена (Sato K. с соавт., *Cancer Res* 1993, 53, 851-856).

Известны также методы замены аминокислоты антитела для улучшения активности, физических свойств, фармакокинетики, безопасности и другие, связанные с антителами, такие как методы, описанные ниже. В одном объекте настоящего изобретения антитела, в которых осуществлены такие замены аминокислот (включая делеции и вставки), также включены в применяемое антитело.

В качестве методов применения аминокислотных замен в вариабельной области антитела IgG описаны гуманизация (Tsurushita N, Hinton PR, Kumar S., *Methods*, 2005, 36(1):69-83), а также созревание аффинности путем замены аминокислот в области, определяющей комплементарность (CDR), для усиления связывающей активности (Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(24):8466-8471), и улучшение физико-химической стабильности путем замены аминокислот в каркасе (FR) (Ewert S, Honegger A, Pluckthun A., *Methods*. 2004, 34(2):184-199. Обзор.). Кроме того, для осуществления аминокислотных замен в Fc-области антитела IgG известны методы усиления антителозависимой цитотоксической активности (ADCC) и комплементзависимой цитотоксической активности (CDC) (Kim SJ, Park Y, Hong HJ., *Mol Cells*, 2005, 20(1):17-29. Обзор.). Кроме того, сообщалось о методах замены аминокислот в Fc, которые не только усиливают такие эффекторные функции, но и улучшают период полувыведения антител из крови (Hinton PR, Xiong JM, Johlf s MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., *J Immunol*. 2006, 176(1):346-356; Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., *Nat Biotechnol*. 1997; 15(7):637-640). Известны также различные методы замены аминокислот в константных областях, направленные на улучшение физических свойств антител (WO 09/41613).

Известны также методы получения антител человека. Например, желаемое антитело человека, обладающее связывающей активностью по отношению к антигену, может быть получено путем сенсibilизации лимфоцитов человека *in vitro* требуемым антигеном или клеткой, экспрессирующей требуемый антиген, и слияния сенсibilизированных лимфоцитов с клетками миеломы человека,

например, U266 (см. JP 1-59878 B). Требуемое антитело человека также может быть получено путем иммунизации трансгенного животного антигеном, имеющим все репертуары гена антитела человека (см. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735). Кроме того, также известна методика получения человеческого антитела путем пэннинга с использованием библиотеки антител человека. Например, можно выбрать фаг, который связывается с антигеном, экспрессируя переменную область антитела человека в виде одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага с помощью метода фагового дисплея. Анализируя ген выбранного фага, можно определить последовательность ДНК, кодирующую переменную область антитела человека, которая связывается с антигеном. После того, как последовательность ДНК scFv, которая связывается с антигеном, будет выявлена, можно сгенерировать соответствующий вектор экспрессии, содержащий последовательность, и получить антитело человека. Эти методы уже хорошо известны, и можно сослаться на их описание в 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 также включает такие антитела человека.

Когда ген антитела выделяют и вводят в подходящего хозяина для получения антитела, можно использовать соответствующую комбинацию хозяина и вектора экспрессии. Когда в качестве хозяина используют эукариотическую клетку, можно использовать животную клетку, растительную клетку и грибную клетку. В качестве животных клеток известны (1) клетки млекопитающего, такие как CHO, COS, миелома, ВНК (почка детеныша хомяка), HeLa, Vero, (2) клетки амфибии, такие как ооцит *Xenopus*, и (3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 или Tn5. В качестве растительных клеток известны клетки из рода *Nicotiana*, например, *Nicotiana tabacum*, которые можно культивировать в виде каллуса в качестве продуцентов. Из грибов известны дрожжи, например, из рода *Saccharomyces*, например, *Saccharomyces cerevisiae*, нитчатые грибы, например, из рода *Aspergillus*, например, *Aspergillus niger*, и другие. При использовании прокариотических клеток продуцирующие системы используют бактериальные клетки. *E. coli* и *Bacillus subtilis* представляют бактериальные клетки. Антитела получают путем интродукции

представляющего интерес гена антитела в эти клетки путем трансформации и культивирования трансформированных клеток *in vitro*.

К антителам, используемым в фармацевтическом составе, дополнительно относятся модифицированные антитела. Например, антитела, связанные с различными молекулами, такими как полиэтиленгликоль (PEG) и цитотоксические агенты, также могут быть использованы (*Farmaco*. 1999 Aug 30; 54(8): 497-516., *Cancer J*. 2008 May-Jun; 14 (3): 154-169.). Такое модифицированное антитело может быть получено путем химической модификации антитела. Эти методы уже разработаны в данной области.

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может быть химерным антителом. Химерные антитела описаны, например, в патенте US 4816567 и публикации Morrison с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81:6851-6855. Химерные антитела могут содержать переменные области, не принадлежащие человеку, (например, переменные области, полученные от приматов (но не людей), таких как обезьяны, от мышей, крыс, хомяков, кроликов или других животных) и константные области антител человека.

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему описанию может быть гуманизированным антителом. Как правило, антитела, не являющимися антителами человека, гуманизируют для снижения их иммуногенности у людей, сохраняя при этом специфичность и аффинность родительского антитела, не являющегося антителом человека. Обычно гуманизированные антитела содержат одну или несколько переменных областей, среди которых присутствуют HVR, такие как CDR (или их части), производные от антител, не являющихся антителами человека, и FR (или их части), полученные из последовательностей антител человека.

Гуманизированные антитела могут необязательно содержать по крайней мере часть константной области человека. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения аминокислотные остатки FR в гуманизированном антителе могут быть заменены соответствующими аминокислотными остатками антител, не являющихся антителами человека, (например, антитела, из которого был получен остаток HVR), например, для поддержания или улучшения специфичности или сродства антитела.

Гуманизированные антитела и методы их получения рассмотрены, например, в следующей публикации (Almagro и Fransson, *Front. Biosci.* 2008, 13:1619-1633) и дополнительно описаны, например, в: Riechmann с соавт., *Nature* 1988, 332:323-329; Queen с соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 1989, 86:10029-10033; патентах US 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri с соавт., *Methods* 2005, 36:25-34 (описание пересадки остатков, определяющих специфичность (SDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 1991, 28:489-498 (описание «перетасовки»); Dall'Acqua с соавт., *Methods* 2005, 36:43-60 (описание «перетасовки FR»); Osbourn с соавт., *Methods* 2005, 36:61-68; Klimka с соавт., *Br. J. Cancer*, 2000, 83:252-260 (описание подхода «направленного отбора» применительно к перетасовке FR).

В одном из объектов настоящего изобретения человеческим каркасом, используемым для гуманизации, может быть, например, каркас, выбранный с использованием метода «наилучшего соответствия» (Sims с соавт. *J. Immunol.* 1993, 151:2296), каркас, полученный из консенсусной последовательности человеческого антитела определенной подгруппы с переменными областями тяжелой или легкой цепи (Carter с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:4285; Presta с соавт., *J. Immunol.*, 1993, 151:2623), каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (Васа с соавт., *J. Biol. Chem.* 1997, 272:10678-10684; Rosok с соавт., *J. Biol. Chem.* 1996, 271:22611-22618).

В одном из объектов настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может быть антителом человека. Антитела человека могут быть получены различными методами. Антитела человека описаны, например, в публикациях van Dijk и van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001, 5: 368-374, и Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20:450-459. Антитела человека могут быть получены путем введения иммуногена трансгенному животному, которое было изменено для получения полного антитела человека или полного антитела с переменными областями человека в ответ на антиген. Такие животные обычно содержат все или некоторые из локусов иммуноглобулинов человека, и все или некоторые из локусов иммуноглобулинов человека заменяют эндогенные иммуноглобулиновые локусы или присутствуют вне хромосом или случайным образом включены в хромосомы животных.

У таких трансгенных мышей эндогенные локусы иммуноглобулинов обычно инактивированы. Для обзора методов получения антител человека из трансгенных животных см. публикацию Lonberg, *Nat. Biotech.* 2005, 23:1117-1125. См. также, например, патенты US 6075181 и US 6150584, описывающие технологию XENOMOUSE (товарный знак); US 5770429, описывающий технологию HUMAB (зарегистрированный товарный знак); US 7041870, описывающий технологию К-М MOUSE (зарегистрированный товарный знак); и описание технологии VELOCIMOUSE (зарегистрированный товарный знак) в US 2007/0061900. Варибельная область человека из полного антитела, полученного от таких животных, может быть дополнительно модифицирована, например, путем объединения ее с другой константной областью человека.

В другом объекте настоящего изобретения антитела человека также могут быть получены методами на основе гибридом. Ниже описаны клетки миеломы человека и линии клеток гетеромиеломы мыши-человека для производства моноклональных антител человека (например, Kozbor, *J. Immunol.* 1984, 133, 3001; Brodeur с соавт., в кн.: «*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*», Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, 1987, pp. 51-63; и Voerner с соавт., *J. Immunol.* 1991, 147: 86. Антитела, полученные по технологии с применением гибридом В-клеток человека, описаны в публикации Li с соавт. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103:3557-3562. К примерам других может относиться метод, описанный в патенте US 7189826 (описывающем производство моноклональных антител IgM человека из линий клеток гибридомы), и метод в публикации Ni, *Xiandai Mianyixue*, 2006, 26(4):265-268 (описание гибридом человека-человека). Технология гибридомы человека (технология триомы) описана в публикациях Vollmers и Brandlein, *Histology and Histopathology*, 2005, 20(3):927-937, и Vollmers и Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 2005, 27(3):185-191.

В другом объекте настоящего изобретения антитела человека также могут быть получены путем выделения последовательностей варибельных доменов Fv-клонов, выбранных из библиотек фагового дисплея, полученных от человека. Такие последовательности варибельных областей затем могут быть объединены с желаемой константной областью человека. Ниже приведены методы выбора антител человека из библиотек антител.

В одном из объектов настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению может быть выделено путем скрининга комбинаторных библиотек для выявления антител, имеющих одну или несколько требуемых активностей. Например, методы получения библиотек фагового дисплея и методы скрининга таких библиотек для выявления антител, имеющих требуемые связывающие свойства, известны в данной области. Такие методы рассмотрены в публикации Hoogenboom с соавт. в кн.: «Methods in Molecular Biology», под ред. O'Brien с соавт., изд. Human Press, Тотова, Нью-Джерси, 2001, 178:1-37, а также, например, в публикациях McCafferty с соавт., *Nature* 348:552-554; Clackson с соавт., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks с соавт., *J. Mol. Biol.* 1992, 222: 581-597; Marks и Bradbury, *Molecular Biology* 2003, 248:161-175, под ред. Lo, изд. 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 методе фагового дисплея в одном из объектов настоящего изобретения репертуары VH и VL могут быть клонированы отдельно с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) и случайным образом рекомбинированы в фаговой библиотеке, которая может быть проверена скринингом на антигенсвязывающие фаги, как описано в публикации Winter с соавт., *Ann. Rev. Immunol.*, 1994, 12: 433-455. Фаги представляют фрагменты антител, такие как scFv и Fab. Библиотеки из иммунизированных источников могут обеспечить высокоаффинные антитела к иммуногенам без необходимости создания гибридом. В другом варианте осуществления настоящего изобретения наивные репертуары также могут быть клонированы (например, от людей) без иммунизации для обеспечения антител одного происхождения к широкому спектру чужеродных или собственных антигенов, как описано в публикации Griffiths с соавт., *EMBO J*, 1993, 12: 725-734. В еще одном варианте осуществления наивные библиотеки могут быть получены синтетически путем клонирования предварительно перестроенных сегментов V-гена из стволовых клеток и использования праймеров PCR, которые кодируют гипервариабельную область CDR3 и содержат случайные последовательности для достижения восстановления *in vitro*, как описано в публикации Hoogenboom и Winter, *J. Mol.*

*Biol.*, 1992, 227: 381-388. Примеры патентной литературы, описывающие фаговые библиотеки антител человека, включают US 5750373, US2005/0079574, US2005/0119455, US2005/0266000, US2007/0117126, US2007/0160598, US2007/0237764, US2007/0292936 и US2009/0002360.

5 В настоящем изобретении антитела или фрагменты антител, выделенные из библиотек антител человека, рассматривают как антитела человека или фрагменты антител человека.

В одном объекте настоящего изобретения антитело по настоящему изобретению представляет собой мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело). Мультиспецифические антитела представляют собой антитела (например, моноклональные антитела), которые обладают специфическое связывание по крайней мере с двумя различными сайтами. В одном варианте осуществления настоящего изобретения одна из специфичностей связывания относится к одному антигену, а другая – к другому антигену. В другом варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело может связываться с двумя различными эпитопами антигена.

Биспецифические антитела могут применяться для локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих антиген.

Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или в виде фрагментов антител.

Примерами метода получения мультиспецифического антитела являются, помимо прочего, рекомбинантная коэкспрессия двух пар тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, имеющих разную специфичность (например, Milstein и Cuello, *Nature* 1983, 305: 537, WO93/08829, Traunecker с соавт., *EMBO J.* 1991, 10: 3655), и метод «выступ-во-впадину» (например, патент US 5731168).

Мультиспецифическое антитело также может быть получено путем манипулирования электростатическими управляющими эффектами для получения гетеродимерной молекулы Fc (например, WO2009/089004A1); сшиванием двух или более антител или фрагментов антител (например, патент US 4676980 и Brennan с соавт., *Science*, 1985, 229: 81); создания антитела с двумя специфичностями с использованием лейциновой молнии (например, Kostelny с соавт., *J. Immunol.*, 1992, 148(5):1547-1553); создания фрагмента биспецифического антитела с использованием техники «диатела» (например,

Hollinger с соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:6444-6448); использования димера scFv (например, Gruber с соавт., *J. Immunol.*, 1994, 152:5368); и создания триспецифического антитела (например, Tutt с соавт. *J. Immunol.* 1991, 147: 60). Более того, это может быть антитело, модифицированное таким образом, чтобы  
5 иметь три или более функциональных антигенсвязывающих участка, включая «антитело-осьминог» (например, US 2006/0025576).

В одном объекте настоящего изобретения антитело или его фрагмент по настоящему изобретению может представлять собой «Fab двойного действия» или «DAF», который содержит один антигенсвязывающий сайт, который  
10 связывается с одним антигеном и другим, отличным от него антигеном (например, US 2008/0069820).

В одном из объектов настоящего изобретения антитело с измененной аминокислотной последовательностью (мутант) в настоящем изобретении может  
15 быть получено путем интродукции соответствующих модификаций в нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу антитела, или путем синтеза пептидов. Такие модификации могут быть сделаны одним изменением или соответствующим образом объединенным множеством произвольных делеций, вставок или замен любой аминокислоты (остатка) в аминокислотной  
20 последовательности. Любая комбинация делеций, вставок и замен может быть использована, пока конечная конструкция имеет требуемые характеристики (например, связывание антигена).

В одном из объектов настоящего изобретения, когда предусмотрены варианты антител (мутанты) с одной или несколькими заменами аминокислот, целевые сайты для интродукции замещающих мутаций могут включать HVR и  
25 FR. В одном из объектов настоящего изобретения концентрация антитела в водном растворе может находиться в диапазоне от 10 до 300 мг/мл, от 20 до 200 мг/мл или от 30 до 150 мг/мл.

## 2. Поверхностно-активное вещество

В одном из объектов настоящего изобретения фармацевтический состав  
30 дополнительно содержит в качестве поверхностно-активного вещества полуксамер, такой как полуксамер 188, полисорбат, такой как полисорбат 20 и полисорбат 80, Triton X, такой как Triton (зарегистрированная торговая марка) X-100 и Triton X-114, Brij, такой как Brij (зарегистрированная торговая марка)-

35 и Brij -58, и неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как Nonidet (торговая марка) P-40, октилглюкозид и октилтиоглюкозид, но не ограничиваются ими.

В одном из объектов настоящего изобретения количество поверхностно-активного вещества, добавляемого в фармацевтический состав, обычно составляет от 0,001 до 100 мг/мл, предпочтительно от 0,01 до 10 мг/мл, от 0,05 до 5 мг/мл и более предпочтительно от 0,1 до 1 мг/мл.

(1) Полоксамер

В настоящем изобретении полоксамер представляет собой блок-сополимер этиленоксида и пропиленоксида. В настоящем изобретении термины «сополимер полиэтиленоксида/полипропиленоксида», «PPC», «PX» или «полоксамер» означают блок-сополимер, представленный следующей формулой Ia:



который содержит центральный блок из полипропиленоксида (PPO), причем полипропиленоксид (PPO) является центральным блоком, и блоками полиэтиленоксида (PEO), расположенными по обеим сторонам.

В приведенной выше формуле: a, b и c представляют собой средние числа, a и c могут быть одинаковыми или разными. Каждое из обозначений, a и c, представляет собой такое число, что гидрофильная часть, представленная (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) (т.е. часть полиэтиленоксида сополимера), составляет около 60–90% от массы сополимера, например, 70–90% от массы сополимера; и b представляет собой такое число, что гидрофобное вещество, представленное (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O)<sub>b</sub> (т.е. часть полипропиленоксида сополимера), имеет молекулярную массу приблизительно от 950 до 4000 дальтон (Da), например, приблизительно от 1200 до 3500 Da, например, от 1200 до 2300 Da, от 1500 до 2100 Da, от 1400 до 2000 Da или от 1700 до 1900 Da. Например, молекулярная масса гидрофильной части может составлять от 5000 до 15000 Da. Примерами полоксамеров, имеющих приведенную выше общую формулу, являются полоксамеры, где a или c представляют собой число от 5 до 150, b представляет собой число от 15 до 75, например, a и c представляют собой числа между примерно 60 и 85, предпочтительно между 75 и 85, например 79, b представляет собой число между 22 и 40, предпочтительно между 22 и 33, 25 и 30 или 35 и 40, и наиболее предпочтительно между 22 и 33. Средняя общая молекулярная масса соединения

составляет приблизительно 6840-9510 Da, предпочтительно 6840-8830 Da или 7680-9510 Da, например, обычно 8400-8800 Da, например около 8400 Da или 8400 Da. Примеры полуксамеров включают полуксамер 188 (например, те продукты, которые продаются под маркой Pluronic (зарегистрированная торговая марка) F-68, Synregonic (торговая марка) PE/F 68, Flocor (зарегистрированная торговая марка), Kolliphor (зарегистрированная торговая марка) и Lutrol (зарегистрированная торговая марка), Poloxamer 188 EMPROVE (зарегистрированная торговая марка) EXPERT, Pronon (зарегистрированная торговая марка)). Качество коммерческого полуксамера 188 различается у разных поставщиков. Кроме того, качество полуксамера 188 может различаться от партии к партии, даже если они одного сорта от одного поставщика. Примерами полуксамеров также являются полуксамер 237 (например, те продукты, которые продаются под названием Pluronic (зарегистрированная торговая марка) F-87 и Synregonic (торговая марка) PE/F 87).

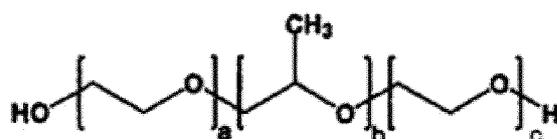
Номенклатура сополимеров полиэтиленоксида/полипропиленоксида связана с составом мономера. Умножение двух верхних цифр номера полуксамера на 100 дает приблизительную молекулярную массу гидрофобного блока полипропиленоксида. Умножение последней цифры на 10 позволяет получить приблизительный весовой процент содержания гидрофильного полиэтиленоксида. Например, полуксамер 188 представляет собой полимер, содержащий гидрофильный полиэтиленоксидный блок, составляющий около 80% от общей молекулярной массы, и содержащий около 1800 Da гидрофобного вещества полипропиленоксида. Кроме того, полуксамер 237 представляет собой полимер, содержащий гидрофильный полиэтиленоксидный блок, составляющий около 70% от общей молекулярной массы, и содержащий около 2300 Da гидрофобного вещества полипропиленоксида. В настоящем описании полиэтиленоксид также называется полиоксиэтиленом, а полипропиленоксид также называется полиоксипропиленом.

Полуксамеры можно синтезировать в два этапа, сначала путем построения ядра из оксида полипропилена, а затем путем добавления полиэтиленоксида к концам ядра из оксида полипропилена. Из-за изменчивости скоростей полимеризации на обоих этапах полуксамеры включают гетерогенные виды полимеров с различной молекулярной массой. Распределение видов полимеров

можно охарактеризовать с помощью стандартных методов, включая, но не ограничиваясь ею, гель-проникающую хроматографию (GPC).

В качестве одного из вариантов осуществления настоящего изобретения среднее количество блоков полиэтиленоксида и полипропиленоксида, содержащихся в различных полуксамерах, а также их среднечисловая молекулярная масса показаны в табл. 1.

Таблица 1.



Тип полуксамера	Этиленоксид Единицы (a) (c)	Пропиленоксид (b)	Среднечисленная молекулярная масса
124	10-15	18-23	2090-2360
188	75-85	25-30	7680-9510
237	60-68	35-40	6840-8830
338	137-146	42-47	12700-17400
407	95-105	54-60	9840-14600

10 В настоящем описании a, c и b в формуле I:



представляющей полуксамер, означают среднее число единиц  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$  и  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в полуксамере, соответственно. Здесь  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})$  означает  $((\text{CH}_2)_2\text{O})$  и также называется единицей этиленоксида (EO).  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  означает  $(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{O})$  и также называется единицей пропиленоксида (PO). Среднее значение единиц этиленоксида и пропиленоксида можно рассчитать, определив соотношение EO/PO представляющей интерес фракции полуксамера с помощью NMR, а затем используя молекулярную массу, полученную с помощью MALDI-FTICR-MS этой фракции, в качестве входного значения. Соотношение EO/PO рассчитывают исходя из следующего уравнения, где пик метильной группы в NMR представляет собой интеграл площади пропиленоксида  $I_{\text{PO}}$  и  $I_{\text{EO+PO}}$  представляет собой объединенный интеграл площади этиленоксида (4 атома водорода) и пропиленоксида (3 атома водорода) (непатентная литература2).

$$\text{EO/PO} = (I_{\text{EO+PO}}/I_{\text{PO}} - 1) \times (3/4)$$

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения поллоксамер 188 (также называемый P-188, PX188 или P188) относится к сополимеру полиэтиленоксида/полипропиленоксида, имеющему следующую формулу Ia:



5 где a, b и c представляют собой средние числа, a и c могут быть одинаковыми или разными, каждое из них представляет такое число, что гидрофильная часть, представленная (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) (т.е. часть полиэтиленоксида сополимера), составляет около 60–90%, например 80%, b представляет собой такое число, что гидрофобное вещество, представленное (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), имеет  
10 молекулярную массу приблизительно 1300-2300 Да, например 1400-2000 Да, например приблизительно 1750 Да. Например, a и c представляют собой числа примерно 75-85, например, 79, b представляет собой число 25-30 или, что предпочтительнее, 22-33, например, 28. Средняя общая молекулярная масса соединения составляет приблизительно 7680-9510 Да, например, обычно 8400-  
15 8800 Да, например, около 8400 Да или 8400 Да. Поллоксамер 188 может содержать гетерогенное распределение видов полимеров, которые различаются в первую очередь по общей длине полимерной цепи, но также включают расщепленные полимерные цепи с ненасыщенностью и некоторые низкомолекулярные гликоли. Те, которые демонстрируют профили видов  
20 (например, определенные с помощью ГПХ), которые включают основные пики, представляющие виды полимеров с низкой молекулярной массой (LMW) и высокой молекулярной массой (HMW), и пики «плечей» с обеих сторон, также включены в поллоксамер 188. В одном из объектов настоящего изобретения поллоксамер может представлять собой поллоксамер, полученный путем очистки  
25 поллоксамера 188 для удаления или уменьшения видов, отличных от основного компонента.

В Японской фармакопее поллоксамер 188 может называться «полиоксиэтилен (160) полиоксипропилен (30) гликоль».

30 При использовании в настоящем описании, термины «основной компонент» или «основной пик» в отношении поллоксамера 188 относится к виду молекул сополимера, имеющих молекулярную массу менее примерно 13000 Да и более примерно 4500 Да и среднечисловую молекулярную массу примерно 7680-9510 Да, например, обычно 8400-8800 Да, например около 8400 Да или 8400 Да.

К основным видам пиков относятся те, которые элюируют с помощью гелепроникающей хроматографии (GPC) в течение 14–15 мин в зависимости от хроматографических условий (см. патент US 5696298).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения поллоксамер 237 (также называемый P-237, PX237 или P237) относится к сополимеру полиэтиленоксида/полипропиленоксида, имеющему следующую формулу Ia:



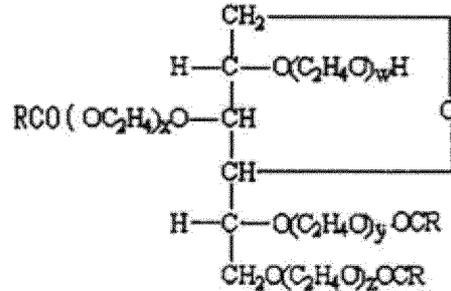
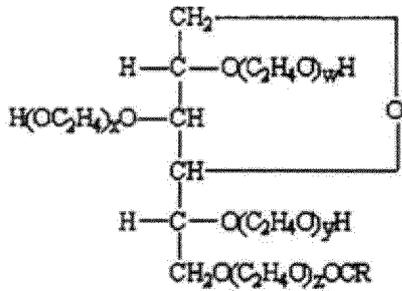
где a, b и c представляют собой средние числа, a и c могут быть одинаковыми или разными, каждое из них представляет такое число, что гидрофильная часть, представленная (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) (т.е. часть полиэтиленоксида сополимера), составляет около 60–80%, например 70%, b представляет собой такое число, что гидрофобное вещество, представленное (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), имеет молекулярную массу приблизительно 1800–2800 Да, например 2000–2600 Да, например приблизительно 2300 Да. Например, a и c представляют собой числа примерно 60–68, например, 64, b представляет собой число 35–40 или, что предпочтительнее, 32–43, например, 37. Средняя общая молекулярная масса соединения составляет приблизительно 6840–8830 Да, например, обычно 7500–8000 Да, например, около 7800 Да или 7800 Да. Поллоксамер 237 может содержать гетерогенное распределение видов полимеров, которые различаются в первую очередь по общей длине полимерной цепи, но также включают расщепленные полимерные цепи с ненасыщенностью и некоторые низкомолекулярные гликоли. Те, которые демонстрируют профили видов (например, определенные с помощью GPC), которые включают основные пики, представляющие низкомолекулярные (LMW) и высокомолекулярные (HMW) виды полимеров, и пики «плечей» с обеих сторон, также включены в поллоксамер 237.

В одном из объектов настоящего изобретения поллоксамер может представлять собой поллоксамер, полученным путем очистки поллоксамера 237 для удаления или уменьшения содержания видов, отличных от основного компонента.

(2) Полисорбат

Полисорбат представляет собой эфир жирной кислоты, который используется в качестве неионогенного поверхностно-активного вещества и стабилизатора белков, имеет следующую химическую формулу II или III:

5      Формула I



где  $w + x + y + z$  означает целое число, выбранное из 15-25, и

R независимо означает алкил или алкенил, содержащий 11 атомов углерода или более.

- 10      Полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 и полисорбат 80 широко используют в качестве стабилизаторов и эмульгаторов в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. Полисорбат 20 в основном содержит монолауратный эфир полиоксиэтилена (20) сорбитана. Полисорбат 40 в основном содержит монопальмитатный эфир полиоксиэтилена (20) сорбитана.
- 15      Полисорбат 60 в основном содержит моностеаратный эфир полиоксиэтилена (20) сорбитана. Полисорбат 80 в основном содержит моноолеатный эфир полиоксиэтилена (20) сорбитана.

Полисорбат часто представляет собой смесь различных химических веществ, состоящую в основном из моноэфиров полиоксиэтилена (20) сорбитана, а иногда содержащую примеси изосорбидных эфиров. Они также могут включать, например, полиэтиленгликоль (PEG), промежуточные структуры и реагенты жирных кислот. Головная группа (в данном случае полиоксиэтилен (20) сорбитан) представляет собой сорбитан (включая 1,4-ангидросорбитол, 1,5-ангидросорбитол и 1,4,3,6-диангидросорбитол) с тремя его спиртовыми

25      группами, замещенными для образования эфирных связей с тремя группами полиэтиленоксида.

### (3) Другие добавки

В одном из объектов настоящего изобретения фармацевтический состав может быть приготовлен путем смешивания с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями, средами и т.п., по мере необходимости, для

5 получения раствора. Растворителем для раствора является вода или фармацевтически приемлемый органический растворитель. Примеры таких органических растворителей включают пропиленгликоль (1,2-пропандиол), полиэтиленгликоль 300, полиэтиленгликоль 400, этанол, глицерин и уксусную

10 кислоту. Примеры подходящих фармацевтически приемлемых носителей и сред включают стерильную воду, физиологический раствор, стабилизаторы, антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота), буферные агенты (такие как фосфорная кислота, лимонная кислота, гистидин и другие органические

15 кислоты), консерванты, хелатирующие агенты (такие как EDTA) и связующие вещества. Кроме того, могут содержаться другие низкомолекулярные полипептиды, белки, такие как сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулин, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, метионин, аргинин и лизин, сахара и углеводы, такие как полисахариды и моносахариды, а также сахарные

20 спирты, такие как маннит и сорбит. При применении в виде раствора для инъекций примерами водного раствора являются физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу или другие вспомогательные вещества, например, D-сорбит, D-маннозу, D-маннит и хлорид натрия, которые могут использоваться в сочетании с соответствующим солюбилизующим

25 агентом, например, спиртом (таким как этанол) и полиспиртом (таким как пропиленгликоль и PEG).

В одном из объектов настоящего изобретения буферный агент, используемый в составе раствора, готовят с использованием вещества для поддержания pH раствора. В одном объекте настоящего изобретения в составе раствора, содержащего высококонцентрированные антитела, pH раствора

30 предпочтительно составляет 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 буферный агент, который может быть использован, представляет собой буферный агент, который является фармацевтически приемлемым и может

регулировать рН в этом диапазоне. Такие буферные агенты известны специалистам в области таких растворов, их примерами являются неорганические соли, такие как фосфаты (фосфат натрия или калия), гидрокарбонат натрия и другие подобные соли; соли органических кислот, такие как цитрат (цитрат натрия или калия), ацетат натрия, сукцинат натрия и тому подобное; и кислоты, такие как фосфорная кислота, угольная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота, яблочная кислота или глюконовая кислота. Другие примеры включают буферные агенты Tris и Good, такие как MES, MOPS или HEPES, гистидин (например, гидрохлорид гистидина) и глицин.

10           Концентрация буферного агента обычно составляет 1-500 ммоль/л, предпочтительно 5-100 ммоль/л, более предпочтительно 10-20 ммоль/л. При использовании гистидинового буферного агента буферный агент предпочтительно содержит 5-25 ммоль/л гистидина, более предпочтительно 10-20 ммоль/л гистидина.

15           В одном из объектов настоящего изобретения состав раствора, содержащего антитело в высокой концентрации, предпочтительно стабилизируют добавлением стабилизатора, подходящего для антитела, которое является активным ингредиентом. В одном объекте настоящего изобретения, «стабильный» состав раствора, содержащего антитело высокой концентрации, не  
20           имеет существенных изменений, наблюдаемых в течение по меньшей мере 12 месяцев, предпочтительно двух лет, более предпочтительно трех лет при температуре охлаждения (2-8°C); или в течение по меньшей мере трех месяцев, предпочтительно шести месяцев, более предпочтительно одного года при комнатной температуре (22-28°C). Например, общее количество димера и  
25           продукта разрушения после 2 лет хранения при 5°C составляет 5,0% или менее, предпочтительно 2% или менее, еще более предпочтительно 1,5% или менее, или общее количество димера и продукта разложения после 6 месяцев хранения при 25°C составляет 5,0% или менее, предпочтительно 2% или менее, еще более предпочтительно 1,5% или менее.

30           Кроме того, состав по настоящему изобретению может необязательно содержать криопротектор, суспендирующий агент, агент, способствующий растворению, изотонический агент, консервант, антиадсорбционный агент,

разбавитель, эксципиент, регулятор pH, анальгетик, серосодержащий восстанавливающий агент, антиоксидант и тому подобное.

Примерами криопротекторов являются сахара, такие как трегалоза, сахароза и сорбит.

5           Примерами агентов, способствующих растворению, являются полиэтиленоксидное отвердевшее касторовое масло, полисорбат 80, амид никотиновой кислоты, полиэтиленоксид сорбитан монолаурат, макрогол и этиловые эфиры жирных кислот касторового масла.

10           Примерами изотонических агентов являются хлорид натрия, хлорид калия и хлорид кальция.

Примерами консервантов являются метилпараоксибензоат, этилпараоксибензоат, сорбиновая кислота, фенол, крезол и хлоркрезол.

15           Примерами антиадсорбционного агента являются сывороточный альбумин человека, лецитин, декстран, сополимер этиленоксида и пропиленоксида, гидроксипропилцеллюлоза, метилцеллюлоза, полиэтиленоксидное отвердевшее касторовое масло и полиэтиленгликоль.

20           Примерами серосодержащих восстановителей являются N-ацетилцистеин, N-ацетилгомоцистеин, тиоктовая кислота, тиодигликоль, тиоэтанолламин, тиоглицерин, тиосорбит, тиогликолевая кислота и ее соль, тиосульфат натрия, глутатион и те, которые имеют сульфгидрильную группу, такие как

20           тиоалкановая кислота, содержащая от 1 до 7 атомов углерода.

25           Примерами антиоксидантов являются эриторбиновая кислота, дибутилгидрокситолуол, бутилгидроксианизол, альфа-токоферол, ацетат токоферола, L-аскорбиновая кислота и ее соль, пальмитат L-аскорбиновой и

25           пальмитиновой кислот, стеарат L-аскорбиновой кислоты, бисульфит натрия, сульфит натрия, триамилгаллат, пропилгаллат или хелатирующий агент, такой как динатрийэтилендиаминтетраацетат (EDTA), пирофосфат натрия или метафосфат натрия.

30           4. Поверхностно-активное вещество, уменьшающее образование частиц

30           (1) Гидрофобность

В одном из объектов настоящего изобретения использование высокогидрофобного поверхностно-активного вещества позволяет уменьшить образование частиц в фармацевтическом составе, содержащем антитела.

Полоксамер представляет собой амфифильный сополимер из трех блоков: одного блока гидрофобной цепи оксида полипропилена (РРО) и двух блоков гидрофильной цепи оксида полиэтилена (РЕО), расположенных по обеим сторонам, где цепь РРО состоит из среднего числа оксидов пропилена в количестве 22-40, предпочтительно 22-33, 25-30 или 35-40, и наиболее предпочтительно 22-33, а цепи РЕО состоят в среднем из 75-85 единиц оксида этилена. Пропиленоксид является гидрофобным компонентом, а этиленоксид является гидрофильным компонентом. Полоксамеры с более гидрофобными компонентами являются более гидрофобными.

10 В одном из объектов настоящего изобретения полоксамер включает полоксамеры, содержащие цепи РРО, состоящие из 34 или более единиц пропиленоксида в количестве 3%, 6%, 20% или 29% (мас./мас.) или более от полоксамера в целом.

15 В одном из объектов настоящего изобретения различия в гидрофобности полоксамеров могут быть подтверждены обращенно-фазовой хроматографией. В обращенно-фазовой хроматографии распределение длины блока РРО может быть определено путем установки блока РЕО так, чтобы он не взаимодействовал со стационарной фазой. Этот метод также позволяет анализировать различия в гидрофобности полоксамеров (непатентная литература 2). В одном из объектов  
20 настоящего изобретения условия для обращенно-фазовой хроматографии полоксамера устанавливают следующим образом со ссылкой на непатентную литературу 2. Для обращенно-фазовой хроматографии используют колонку ВЭЖХ, заполненную макропористым стиролдивинилбензолом, например, колонку PLRP-S компании Agilent Technologies.

25 [Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка PLRP-S (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм; фирма Agilent Technologies)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

30 Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

5 От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

10

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

15

В одном из объектов настоящего изобретения при хроматографии полоксамеров в указанных выше условиях элюаты после 17 мин элюирования соответствуют полоксамерам с высокой гидрофобностью, а площадь пика после 17 минут элюирования составляет 3% или более, 6% или более, 19% или более, 33% или более, 35% или более от общей площади пика.

20

В одном из объектов настоящего изобретения при хроматографии полоксамеров в указанных выше условиях площадь пика через 17 мин элюирования составляет 3% или более, 6% или более, 20% или более, 36% или более или 46% или более от общей площади пика через 1,5 минуты.

(2) Поверхностное натяжение

25

В одном из объектов настоящего изобретения использование поверхностно-активного вещества, которое снижает поверхностное натяжение водного раствора, содержащего поверхностно-активное вещество, позволяет уменьшить образование частиц в водном растворе фармацевтического состава, содержащего антитела. В одном из объектов настоящего изобретения примеры поверхностно-активных веществ, которые могут уменьшить образование частиц, включают полоксамер 188, который идентифицирован в примерах настоящего изобретения, а также полоксамер 237, полисорбат 20, полисорбат 60, полисорбат 65 и полисорбат 80. Чем выше способность поверхностно-активного вещества активировать поверхность, тем ниже будет поверхностное натяжение водного раствора, содержащего поверхностно-активное вещество. Существует

30

корреляция между индексом гидрофобности полоксамера и значением поверхностного натяжения.

Поверхностное натяжение можно измерить общеизвестными методами, такими как, помимо прочего, метод Wilhelmy (метод пластины, метод перпендикулярной пластины), метод du Nouy (метод кольца), метод подвески (метод висючей капли) или метод максимального давления пузырька.

В одном из объектов настоящего изобретения водный раствор, содержащий поверхностно-активное вещество в концентрации 0,5 мг/мл, имеет поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее, 52 мН/м или менее, 51 мН/м или менее, 50,7 мН/м или менее, 50,5 мН/м или менее или 39 мН/м или менее.

### (3) Степень ненасыщенности

В одном из объектов настоящего изобретения использование полоксамера с низкой степенью ненасыщенности в качестве поверхностно-активного вещества позволяет уменьшить образование частиц в фармацевтическом составе, содержащем специфическое антитело.

Степень ненасыщенности можно получить с помощью раствора ацетата ртути(II) по методу, указанному в Фармакопее США.

Метод приготовления раствора ацетата ртути(II):

50 г ацетата ртути(II) помещают в мерную колбу объемом 1000 мл и растворяют примерно в 900 мл метанола с 0,5 мл ледяной уксусной кислоты. Разбавляют до нужного объема метанолом, затем перемешивают. Жидкость выливают, если она желтая. Жидкость фильтруют, если она мутная, но если она остается мутной, ее выливают. Если приготовление раствора необходимо повторить, используют новые реагенты. Этот раствор хранят в темном флаконе в темном месте для защиты от света.

Процедура расчета степени ненасыщенности полоксамера:

Около 15,0 г полоксамера переносят в колбу Эрленмейера объемом 250 мл. Взвешивают 50 мл раствора ацетата ртути(II), помещают в колбу с помощью пипетки и перемешивают магнитной мешалкой до полного растворения. Затем смесь оставляют на 30 мин, периодически взбалтывая.

Добавляют 10 г кристаллов бромистого натрия и перемешивают смесь магнитной мешалкой около 2 мин. Немедленно добавляют около 1 мл испытуемого раствора фенолфталеина и выделившуюся уксусную кислоту

титруют 0,1 н гидроксидом калия в метаноле объемным раствором. Проводят контрольный тест тем же методом. Измеряют начальную кислотность. 15,0 г полоксамера растворяют в 75 мл метанола, нейтрализованного гидроксидом калия в метаноле до конечной точки фенолфталеина. Затем добавляют около 1  
5 мл испытуемого тест-раствора фенолфталеина и проводят титрование 0,1 н раствором гидроксида калия в метаноле в объемном растворе с подачей азота.

Степень ненасыщенности (мЭкв/г) рассчитывают по следующей формуле:

$$(V_U - V_B - V_A) N / 15$$

10 где  $V_U$ ,  $V_B$  и  $V_A$  означают объемы раствора (мл) 0,1 н гидроксида калия в метаноле, используемого для титрования испытуемого образца, фонового раствора, и раствора с начальной кислотностью, соответственно, а  $N$  обозначает нормальность волюметрического раствора.

В одном из объектов настоящего изобретения степень ненасыщенности полоксамера, используемого в качестве поверхностно-активного вещества,  
15 составляет менее 0,018 мЭкв/г.

#### 5. Уменьшение образования частиц

##### (1) Уменьшение образования частиц

В одном объекте настоящего изобретения «снижение образования частиц» означает предотвращение образования визуально обнаруживаемых частиц или  
20 уменьшение количества частиц, образующихся в водном растворе фармацевтического состава, в котором образуются визуально обнаруживаемые частицы при данных условиях. Снижение образования визуально обнаруживаемых частиц может быть подтверждено путем подсчета количества частиц. Размер и количество частиц можно измерить с помощью подсчета  
25 частиц при затенении света, микроскопического подсчета частиц, проточной цитометрии с визуализацией, визуального осмотра и микроскопической инфракрасной спектроскопии (IR) или микроскопической раман-спектроскопии после выделения частиц, предпочтительно путем сочетания визуального осмотра и микроскопической инфракрасной спектроскопии или микроскопической  
30 раман-спектроскопии.

##### (2) Визуально обнаруживаемые частицы

В настоящей спецификации визуально обнаруживаемыми называют частицы, которые визуально обнаруживают при высокой освещенности и имеют

диаметр 40 мкм или более. Из них частицы, которые визуаль­но обнаруживаются при стандартной освещенности (около 2000–3000 люкс), как указано в фармакопее, называют «видимыми частицами» или «нерастворимыми видимыми частицами». Видимые частицы обычно имеют диаметр более 100 мкм

5 (непатентная литература 1). Частицы, которые по размеру меньше видимых частиц и не видны при стандартной освещенности (около 2000–3000 люкс), указанной в фармакопее, но могут быть визуаль­но обнаружены путем увеличения освещенности или увеличения времени наблюдения, являются «частицами, визуаль­но обнаруживаемыми только при высокой освещенности» и

10 имеют диаметр от 40 мкм до 100 мкм. Наличие видимых частиц подтверждают путем осторожного вращения или переворачивания контейнера перед черным или белым фоном и визуального осмотра невооруженным глазом в течение 5 секунд или более при стандартной освещенности (около 2000–3000 люкс). Наличие частиц, которые визуаль­но обнаруживают только при высокой

15 освещенности, подтверждаются путем осторожного вращения или переворачивания контейнера перед черным фоном и визуального осмотра невооруженным глазом в течение 30 секунд или более при высокой освещенности (6000 люкс или более). Видимые частицы также могут быть подтверждены путем осмотра при высокой освещенности.

20 В настоящем описании понятие «частица, полученная из белка» означает визуаль­но обнаруживаемую частицу, образованную из белка, включая частицы, состоящие только из белка, и частицы, состоящие из комплекса белка и полидиметилсилоксана (ПДМС). Тот факт, что частицы образуются из молекул белка, может быть подтвержден микроскопической раман-спектроскопией.

25 Единственным белком, содержащимся в растворе, является активный фармацевтический ингредиент (API), причем визуаль­но обнаруживаемые частицы образуются из API. Количество визуаль­но обнаруживаемых частиц можно измерить с помощью подсчета частиц с затенением света, микроскопического подсчета частиц, проточной цитометрии с визуализацией,

30 визуального осмотра и микроскопической инфракрасной спектроскопии (IR) или микроскопической раман-спектроскопии после выделения частиц, предпочтительно с помощью комбинации визуального осмотра и

микроскопической инфракрасной спектроскопии или микроскопической раман-  
спектроскопии.

В настоящем описании термин «агрегат» означает вид белка с относительно  
высокой молекулярной массой, образующийся в результате агрегации большого  
5 количества денатурированных белков; его применяют взаимозаменяемо с  
терминами «макромолекулярные виды» и «HMWS». Белковые агрегаты, как  
правило, могут различаться по следующим параметрам: размер (от небольших  
(димеры) до крупных (микроскопически идентифицируемые или даже видимые  
10 частицы), диаметры которых варьируются от нанометров до микрометров),  
морфология (обычно сферическая или волокнистая), структура белка (наивная  
или ненативная/денатурированная), тип межмолекулярной связи (ковалентная  
или нековалентная), обратимость и растворимость. Растворимые агрегаты  
охватывают диапазон размеров приблизительно 1-100 нм, в то время как  
15 белковые частицы охватывают микроскопически идентифицируемый (примерно  
0,1-100 мкм) диапазон и видимый (>100 мкм) диапазон. Все типы белковых  
агрегатов, описанные выше, как правило, охватываются этим термином. Таким  
образом, термин «(белковый) агрегат» относится к любому виду ненативных  
видов, в которых два или более белковых мономера физически связаны или  
химически связаны.

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

## 5. Контейнер

В одном из объектов настоящего изобретения фармацевтическим составом заполняют контейнер. Контейнер представляет собой пластиковый или стеклянный шприц, картридж или флакон.

5 В одном из объектов настоящего изобретения фармацевтическим составом для введения пациенту заполняют шприц, картридж или флакон. В некоторых вариантах фармацевтический состав помещают в шприц, картридж или флакон на предприятии, где осуществляют розлив. В некоторых вариантах шприц, картридж или флакон стерилизуются перед внесением состава. В некоторых 10 вариантах шприц, картридж или флакон, заполненный фармацевтическим составом, имеет срок хранения 1 день, не менее 7 дней, не менее 14 дней, не менее 1 месяца, не менее 6 месяцев, не менее 1 года или не менее 2 лет до введения фармацевтического состава пациенту. В некоторых вариантах шприц, картридж или флакон подвергают обработке для хранения и/или 15 транспортировки.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения шприцы, картриджи или флаконы подвергают механическому напряжению. Примеры механических напряжений включают, но не ограничиваются ими, падение и вибрационное напряжение. В одном из вариантов осуществления настоящего 20 изобретения шприцы, картриджи или флаконы подвергают падению один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 25 раз или более, 30 раз или более или 40 раз или более. Напряжение, прикладываемое к шприцу, картриджу или флакону при падении, зависит от высоты, ориентации и т.п., а также от числа падений. Пример высоты 25 падения включает, но он не является ограничительным, 38,1 см, согласно Американскому обществу по испытаниям и материалам (ASTM) D4169.

Шприц может быть изготовлен из РР (полипропилена) или стекла. Внутренняя круговая поверхность шприца может быть покрыта силиконовым маслом в качестве смазки.

30 В одном из объектов настоящего изобретения силиконовым маслом является полидиметилсилоксан. Некоторые примеры полидиметилсилоксанов включают Dow Corning (зарегистрированная торговая марка) 360 Medical fluid без ограничений, включая Dow Corning (зарегистрированная торговая марка) 360

Medical Fluid с вязкостью 350 сантистоксов, Dow Corning (зарегистрированная торговая марка) 360 Medical Fluid с вязкостью 1000 сантистоксов, Dow Corning (зарегистрированная торговая марка) 360 Medical Fluid с вязкостью 12500 сантистоксов и Dow Corning (зарегистрированная торговая марка) MDX4-4159 fluid, без ограничений.

В одном из объектов настоящего изобретения размер объема (стандарт) шприца не имеет особых ограничений. Конкретно, объем составляет от 0,5 мл до 5,0 мл, предпочтительно 1 мл или 2,25 мл.

В одном из объектов настоящего изобретения размер объема (стандарт) картриджа не имеет особых ограничений. Конкретно, объем может быть в диапазоне 0,5-20 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 мл, но эти количества не являются ограничительными.

В одном из объектов настоящего изобретения размер объема (стандарт) флакона не имеет особых ограничений. Конкретно, объем может быть в диапазоне 3-100 мл, например, 3 мл, 5 мл, 10 мл, 15 мл, 20 мл, 30 мл, 50 мл или 100 мл, но эти количества не являются ограничительными.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приводимыми ниже примерами, которые не ограничивают рамок охвата настоящего изобретения.

#### Примеры

##### Пример 1. Компонентный анализ полуксамера 188 (PX188) методом обращенно-фазовой хроматографии

Анализ методом обращенно-фазовой хроматографии выполняют для оценки длины блока полипропиленоксида (PPO) для семи типов PX188, включая различных производителей, марки и партии, показанные в табл. 2. Приводят ссылку на предыдущую статью, касающуюся метода анализа длины блока PPO методом обращенно-фазовой хроматографии (непатентная литература 1).

Таблица 2. Информация и оценка результатов по применяемым PX188 и PS80

Типы поверхностно-активных веществ	ID образцов	Фирма	Название продукта	Lot No.	Доля поздних элюатов (%)	Доля поздних элюатов (без начальных элюатов) (%)	Поверхностное натяжение через 600 сек (мН/м)	Ненасыщенность (МЭКВ/Г)
PX188	PX(1)	BASF	Kolliphor® P188	A	33.65	36.79	50.62	0.021
PX188	PX(2)	BASF	Kolliphor® P188	B	6.44	6.76	52.13	0.024
PX188	PX(3)	BASF	Kolliphor® P188	C	3.32	3.47	52.23	0.032
PX188	PX(4)	BASF	Kolliphor® P188 Bio	-	34.33	36.64	50.60	0.020
PX188	PX(5)	Merck	EMPROVE® EXPERT	-	34.78	45.27	50.82	0.026
PX188	PX(6)	Merck	EMPROVE® EXPERT cell culture optimized	-	0.02	0.19	52.87	0.018
PX188	PX(7)	NOF CORPORATION	PLONON (R) #188P	-	19.89	20.43	51.21	0.007
PS80	PS80	NOF CORPORATION	Полисорбат 80 (HX2)	-	NA	NA	38.6	NA

В качестве системы ВЭЖХ используют жидкостный хроматограф Alliance e2695 (фирма Waters), оснащенный испарительным детектором рассеяния света (ELSD) 2424 (фирма Waters), а для сбора и анализа данных используют программное обеспечение Empower 3 (фирма Waters). Для разделения

5 используют колонку PLRP-S (1000 Å, 5 мкм, 50 x 2,1 мм; фирма Agilent Technologies), установленную на температуру колонки  $65 \pm 5^\circ\text{C}$ . Скорость потока зафиксирована на уровне 0,2 мл/мин, применяют линейный градиент с использованием в качестве подвижных фаз: сверхчистой воды (вода Milli-Q) в качестве подвижной фазы А и ацетонитрила в качестве подвижной фазы Б.

10 Детали градиента следующие: от 58% Б до 64% Б (от 0 до 16,0 мин), от 64% Б до 90% Б (от 16,0 до 18,5 мин), фиксированно на 90% Б (от 18,5 до 21,5 мин), от 90% Б до 100% Б (от 21,5 до 23,5 мин), фиксированно на 100% Б (от 23,5 до 30,0 мин), от 100% Б до 58% Б (от 30,0 до 30,1 мин) и фиксированно на 58% Б (от 30,1 до 40,0 мин). Температура дрейфовой трубки ELSD составляет  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ ,

15 уровень мощности нагрева распылителя составляет 75%, значение усиления составляет 250, а давление газа составляет 20 фунтов на квадратный дюйм. Каждый PX188 растворяют в сверхчистой воде до концентрации 0,5 мг/мл, и 20 мкл раствора PX188 вводят в систему ВЭЖХ. Элюаты после 17 мин от начала определяют как «поздние элюаты», и долю поздних элюатов рассчитывают из

20 хроматограммы каждого PX188 (фиг. 1) как отношение (%) площади пика после 17 мин к общей площади пика. Кроме того, отношение площади пика после 17 мин к общей площади пика без учета площади пика до 1,5 мин после начала определяют как «поздние элюаты (без учета начальных элюатов)» и рассчитывают по хроматограмме каждого PX188 (фиг. 1).

25 Кроме того, массовый процент молекулярных видов с длиной блока PPO 34 или более, что соответствует поздним элюатам, рассчитывают для пяти типов PX188. Длину блока PPO каждого элюированного пика рассчитывают, предполагая, что длина блока PPO первого элюированного пика через 17 минут составляет 34. Молекулярная масса молекулярных видов, соответствующих

30 каждому пику элюирования, рассчитывают, предполагая, что длина блока PEO на обоих концах составляет 80. Затем для каждого PX188 рассчитывают массовый процент молекулярных видов с длиной блока PPO 34 или более путем умножения этих молекулярных масс на значения площади пика элюирования для

получения значений и взятия суммы тех, у которых длина блока ППО 34 или более, в качестве числителя, а суммы всех пиков в качестве знаменателя, умноженной на 100. Результаты расчета отношений (масс. %) молекулярных видов с длиной блока РРО 34 или более к общему полуксамеру показаны в табл.

5 3.

Таблица 3. Отношение (мас. %) полоксамеров с длиной блоков PPO 34 или более к целому полоксамеру

Номер блока PPO	Молекулярная масса	PX(3)		PX(2)		PX(7)		PX(1)		PX(5)	
		Площадь (%)	Молекулярная масса * площадь								
16	7986	4.25	33941	4.68	37374	2.67	21323	8.55	68280	0	0
17	8044	0.58	4666	0.64	5148	0.05	402	0.05	402	23.18	186460
18	8102	0.77	6239	0.53	4294	0.11	891	0.05	405	0.08	648
19	8160	1.5	12240	0.97	7915	0.18	1469	0.13	1061	0.08	653
20	8218	2.59	21285	1.67	13724	0.37	3041	0.26	2137	0.1	822
21	8276	4.15	34345	2.84	23504	0.72	5959	0.52	4304	0.17	1407
22	8334	6.43	53588	4.32	36003	1.48	12334	0.99	8251	0.28	2334
23	8392	8.59	72087	5.97	50100	2.41	20225	1.64	13763	0.55	4616
24	8450	9.48	80106	7.85	66333	3.5	29575	2.44	20618	0.97	8197
25	8508	9.5	80826	8.8	74870	4.89	41604	3.64	30969	1.44	12252
26	8566	10.22	87545	8.97	76837	6.61	56621	4.93	42230	2.2	18845
27	8624	9.79	84429	9.63	83049	8.06	69509	6.18	53296	3.17	27338
28	8682	8.39	72842	9.47	82219	9.08	78833	7.27	63118	4.05	35162
29	8740	7.02	61355	8.26	72192	9.39	82069	7.97	69658	5.25	45885
30	8798	5.44	47861	6.95	61146	9.34	82173	7.77	68360	5.87	51644
31	8856	3.74	33121	5.3	46937	8.36	74036	7.52	66597	6.19	54819
32	8914	2.61	23266	3.95	35210	7.11	63379	6.44	57406	6.1	54375
33	8972	1.63	14624	2.77	24852	5.79	51948	5.32	47731	5.55	49795
34	9030	1.05	9482	1.84	16615	4.36	39371	4.18	37745	4.77	43073
35	9088	0.59	5362	1.13	10269	3.01	27355	3.18	28900	3.95	35898
36	9146	0.44	4024	0.76	6951	2.29	20944	3.66	33474	3.24	29633
37	9204	0.41	3774	0.75	6903	2.5	23010	4.1	37736	3.79	34883
38	9262	0.83	7687	1.97	18246	2.04	18894	7.7	71317	3.92	36307
39	9320	0	0	0	0	5.68	52938	5.52	51446	15.11	140825
% (мас./мас.) PX188 с 34 или большим числом блоков PPO		3.55		6.85		20.79		29.64		36.61	

Таблица 3.

Пример 2. Измерение значений поверхностного натяжения PX188 и PS80

Для семи типов PX188 и одного типа PS80, перечисленных в табл. 2, измерены значения поверхностного натяжения водных растворов каждого поверхностно-активного вещества, растворенного в сверхчистой воде в концентрации 0,5 мг/мл. Измерения методом Wilhelmy с использованием поверхностного тензиометра (Force Tensiometer K100C, фирма Kruss) с платиновой пластиной проводят при температуре 20-25°C. В качестве параметров измерения для K100C были установлены скорость обнаружения 6 мм/мин, чувствительность обнаружения 0,005 г и глубина погружения 2 мм, а значения поверхностного натяжения от начала измерения до 600 сек получены с интервалами 60 сек (фиг. 2). Стеклянный контейнер с раствором поверхностно-активного вещества, в который погружена платиновая пластина, промывают многократно изопропиловым спиртом, а затем сверхчистой водой после каждого измерения. Платиновую пластину также промывают изопропиловым спиртом и затем сверхчистой водой, затем очищают путем нагрева ее докрасна спиртовкой после каждого измерения.

Значения поверхностного натяжения различных водных растворов PX188 постепенно снижаются после погружения платиновой пластины и достигают равновесия по истечении 600 сек с начала измерения. Поэтому значения через 600 секунде были приняты в качестве значений поверхностного натяжения различных растворов поверхностно-активных веществ. Хотя значение поверхностного натяжения водного раствора PS80 продолжало снижаться по истечении 600 сек, значение поверхностного натяжения через 600 сек принято для сравнения с водными растворами PX188.

Пример 3. Корреляция между соотношением поздних элюатов и значениями поверхностного натяжения

Проанализирована корреляция между соотношением поздних элюатов семи типов PX188, перечисленных в табл. 2, и значениями поверхностного натяжения, измеренными вышеуказанным методом. Результаты показывают, что между этими двумя показателями существует высокая корреляция (фиг. 3). То есть было показано, что в PX188 соотношение компонентов с длинными блоками РРО коррелирует со значением поверхностного натяжения, которое является показателем способности активировать поверхность, и, кроме того, что значение

поверхностного натяжения уменьшается, когда содержится больше компонентов с длинными блоками РРО.

Пример 4. Подготовка образцов для оценки визуально обнаруживаемых частиц

5 Для исследования влияния различных поверхностно-активных веществ на образование визуально обнаруживаемых частиц используют семь типов РХ188 и один тип РS80, перечисленные в табл. 2, для исследования образования частиц в двух составах моноклональных антител (mAb). Применяемыми mAb являются mAb1 (эмицизумаб, IgG4, гуманизированное биспецифическое моноклональное антитело к фактору свертывания крови IXa/X) и mAb2 (сатрализумаб, IgG2, гуманизированное моноклональное антитело к рецептору IL-6 с pH-зависимым связыванием), произведенные и очищенные фирмой Chugai Pharmaceutical. Для образца mAb1 водный раствор, содержащий 158 мг/мл mAb1, 20 мМ гистидина, 150 мМ аргинина, аспарагиновой кислоты (по необходимости) и 0,5 мг/мл РХ188 или РS80, доводят до pH 6,0, из которых 1 мл заливают во флаконы (стеклянные флаконы, обработанные серой, MURASE GLASS объемом 3 мл). Для образца mAb2 водный раствор, содержащий 123 мг/мл mAb1, 20 мМ гистидина, 150 мМ аргинина, аспарагиновую кислоту (по необходимости) и 0,5 мг/мл РХ188 или РS80, доводят до pH 6,0, из которого в шприцы вводят по 1 мл (1 мл ClearJect, фирма Taisei Kako). Для каждого mAb приготавливают восемь образцов с использованием каждого из восьми поверхностно-активных веществ, перечисленных в табл. 2. Полученные образцы проверяют визуально для исключения образцов, содержащих видимые посторонние вещества на этапе получения образца.

25 Десять образцов mAb1 и mAb2 отнесены к группе, в которой образцы, не содержащие видимых посторонних веществ после визуального осмотра, осматривают визуально после того, как их оставили стоять при температуре 25°C или 40°C. Кроме того, 20 образцов для mAb1 и 40 образцов для mAb2 относят к группе, которая была визуально осмотрена после того, как их оставили стоять при температуре 5°C и подвергали периодическому механическому напряжению.

### Метод периодического приложения механического напряжения

Группу образцов, подвергавшихся периодическому механическому напряжению, оставляют и хранят при температуре 5°C, за исключением случаев, когда механическое воздействие применяют при комнатной температуре.

- 5 Напряжение, сочетающее в себе следующие испытание на падение и испытание на вибрацию (испытание на падение → испытание на вибрацию → испытание на падение), оказывают в соответствии с ASTM D4169 с контейнером, надлежащим образом упакованным для предотвращения повреждений. Для испытания на прочность при падении один набор испытаний на падение состоит из двойного
- 10 падения образцов с высоты 38,1 см одной стороной вниз для каждой из четырех сторон, таким образом, чтобы нагрузка, приложенная к каждому образцу, была равномерной, с использованием аппарата для испытания на падение (PDT-56ED, фирма Lansmont). Один набор этих испытаний на падение выполняют до и после испытания на вибрацию. Для вибрационного напряжения один набор испытаний
- 15 на вибрацию состоит из приложения вибрационного напряжения с четырьмя различными интенсивностями (низкий уровень грузовика 40 мин, средний уровень грузовика 15 мин, высокий уровень грузовика 5 мин и уровень шума I уровня 120 мин) с использованием вибрационного испытательного аппарата (D-5900, фирма Shinken). Как показано на фиг. 4, отмечено, что иногда проводился
- 20 только один набор вибрационных испытаний, а в других случаях проводили четыре набора испытаний подряд, их хронометраж показан на фиг. 6.

#### Пример 5. Образование частиц при выдерживании при 25°C

- Визуальный осмотр образцов проводят после того, как они были выдержаны и хранились в течение 6 месяцев при температуре 25°C в
- 25 соответствии с методами визуального осмотра 1 и 2. Для частиц, обнаруженных визуальным осмотром, идентификацию их состава методом раман-спектрологии проводят с использованием микроскопа для получения раман-изображений (DXR2xi, фирма Thermo Scientific) в соответствии с методом идентификации состава визуально обнаруживаемых частиц методом раман-
- 30 спектрологии.

Метод визуального осмотра 1 (флаконы; mAb1)

Для визуального осмотра флаконов используют стол визуального осмотра (EM-M102-06, Hitachi Industry & Control Solutions). Внешнюю поверхность

флаконов очищают и количество флаконов, содержащих визуально обнаруживаемые частицы в заполненном растворе препарата, подсчитывают невооруженным глазом на черном фоне при освещенности около 20000 люкс.

Метод визуального осмотра 2 (шприцы; mAb2)

5 Для визуального осмотра шприцев используют флуоресцентный свет. Внешнюю поверхность шприцев очищают и количество шприцев, содержащих визуально обнаруживаемые частицы в заполненном растворе препарата, подсчитывают невооруженным глазом на черном фоне и при освещенности около 10000 люкс.

10 Метод определения состава частиц с помощью раман-спектроскопии

Частицы собирают на никелевом фильтре с размером пор 3 мкм (фирма Tokyo Process Service), раман-спектры при облучении лазером с длиной волны 532 нм получают с помощью микроскопа для получения раман-изображений (DXR2xi, фирма Thermo Scientific) для подтверждения того, что они являются  
15 эндогенными белковыми частицами. Спектры получают, используя объектив с 10-кратным или 50-кратным увеличением и устанавливая значения интенсивности лазера (5,0-10,0 мВт), времени экспозиции (0,05-1,0 сек) и количества экспозиций (15-35) в описанных диапазонах для получения соответствующих спектров, позволяющих определить состав. Поскольку  
20 типичными белковыми частицами являются частицы, состоящие только из белка, и частицы, состоящие из комплекса белка и полидиметилсилоксана (ПДМС), примеры их спектров комбинационного рассеяния показаны на фиг. 6.

Количество контейнеров, содержащих белковые частицы, подсчитано для образцов, оставленных на хранение в течение 6 месяцев при температуре 25°C, и  
25 показано в табл. 4. Показано, что как mAb1, так и mAb2 имеют разные пропорции образования частиц в зависимости от типа поверхностно-активного вещества, содержащегося в составе.

Таблица 4. Число визуально обнаруживаемых частиц, сформированных в составах mAb1 и mAb2 в статических условиях при 25°C

Состав	mAb1			mAb2		
	Только белок	Белок-PDMS	Белковые	Только белок	Белок-PDMS	Белковые
	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)
PX(1)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
PX(2)	1/10	2/10	3/10	0/10	1/10	1/10
PX(3)	2/10	2/10	4/10	0/10	0/10	0/10
PX(4)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
PX(5)	1/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10
PX(6)	0/10	5/10	5/10	0/10	2/10	2/10
PX(7)	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
PS80	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

\*Показано (число составов, в которых сформированы визуально обнаруживаемые частицы)/(общее число исследованных составов). Общее число составов, содержащих визуально обнаруживаемые частицы, состоящие только из белка (VP только из белка), и визуально обнаруживаемые частицы, состоящие из комплекса белка и полидиметилсилоксана (VP из белка и PDMS), показаны как количество составов, составов, содержащих белковые визуально обнаруживаемые частицы (Белковые VP).

Пример 6. Образование частиц в статическом положении при 40°C

Визуальный осмотр проводят на образцах, подвергнутых статическому хранению в течение 6 месяцев при температуре 40°C, в соответствии с методами визуального осмотра 1 и 2. Для частиц, обнаруженных при визуальном осмотре, идентификацию состава методом раман-спектроскопии выполняют с использованием микроскопа с раман-визуализацией (DXR2xi, фирма Thermo scientific) в соответствии с методом идентификации состава частиц методом раман-спектроскопии.

Количество контейнеров, содержащих белковые частицы, подсчитано для образцов, оставленных на хранение в течение 6 месяцев при температуре 40°C, как показано в табл. 5. Показано, что как mAb1, так и mAb2 имеют сильно различающиеся пропорции образования частиц в зависимости от типа поверхностно-активного вещества, содержащегося в составе.

Таблица 5.

Таблица 5. Число визуально обнаруживаемых частиц, сформированных в составах mAb1 и mAb2 в статических условиях при 40°C

Состав	mAb1			mAb2		
	Только белок	Белок-PDMS	Белковые	Только белок	Белок-PDMS	Белковые
	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)
PX(1)	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	2/10
PX(2)	1/10	0/10	1/10	1/10	4/10	5/10
PX(3)	1/10	2/10	3/10	0/10	7/10	7/10
PX(4)	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10
PX(5)	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10
PX(6)	0/10	9/10	9/10	1/10	7/10	8/10
PX(7)	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	2/10
PS 80	1/10	0/10	1/10	1/10	0/10	1/10

\* (Число составов, в которых сформированы визуально обнаруживаемые частицы)/(общее число исследованных составов). Общее число составов, содержащих визуально обнаруживаемые частицы, состоящие только из белка (VP только из белка), и визуально обнаруживаемые частицы, состоящие из комплекса белка и полидиметилсилоксана (VP из белка и PDMS), показаны как число составов, содержащих белковые визуально обнаруживаемые частицы (Белковые VP).

Пример 7. Образование частиц при 5°C при статическом положении и в условиях периодического механического напряжения

5 Визуальный осмотр проводят на образцах, подвергнутых статическому хранению при температуре 5°C и периодическому падению и вибрационному

напряжению (образцы, полученные через 6 месяцев для mAb1 и через 3 месяца для mAb2) в соответствии с методами визуального осмотра 1 и 2. Для частиц, обнаруженных при визуальном осмотре, идентификацию состава методом раман-спектроскопии выполняют с использованием микроскопа с раман-визуализацией (DXR2xi, фирма Thermo scientific) в соответствии с методом идентификации состава частиц методом раман-спектроскопии.

Количество контейнеров, содержащих белковые частицы, было подсчитано для образцов, подвергнутых статическому хранению при температуре 5°C и периодическому механическому напряжению, и показано в табл. 6.

Таблица 6. Число визуально обнаруживаемых частиц, сформированных в составах mAb1 и mAb2 при 5°C в статических условиях при периодическим капельным и вибрационным напряжением

Состав	mAb1			mAb2		
	Только белок	Белок-PDMS	Белковые	Только белок	Белок-PDMS	Белковые
	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)	VP (1)	VP (2)	VP (1) + (2)
PX(1)	0/20	0/20	0/20	2/40	0/40	2/40
PX(2)	2/20	0/20	2/20	5/40	0/40	5/40
PX(3)	1/20	1/20	2/20	9/40	0/40	9/40
PX(4)	0/20	0/20	0/20	3/40	0/40	3/40
PX(5)	2/20	0/20	2/20	3/40	0/40	3/40
PX(6)	1/20	0/20	1/20	4/40	1/40	5/40
PX(7)	0/20	0/20	0/20	0/40	0/40	0/40
P S 8 0	0/20	0/20	0/20	0/40	0/40	0/40

\* (Число составов, в которых сформированы визуально обнаруживаемые частицы)/(общее число исследованных составов). Общее число составов, содержащих визуально обнаруживаемые частицы, состоящие только из белка (VP только из белка), и визуально обнаруживаемые частицы, состоящие из комплекса белка и полидиметилсилоксана (VP из белка и PDMS), показаны как число составов, содержащих белковые визуально обнаруживаемые частицы (Белковые VP).

Для mAb2 показано, что пропорция образования частиц сильно варьирует в зависимости от типа поверхностно-активного вещества, содержащегося в составе. Для mAb1 пропорция образования частиц была не столь высокой, и поэтому не использовалась в последующих анализах.

5        Пример 8. Анализ корреляции пропорции образования частиц с пропорцией в поздних элюатах PX188 и значением поверхностного натяжения водного раствора поверхностно-активного вещества

10        Корреляционный анализ проводят для демонстрации корреляции между пропорцией поздних элюатов семи типов PX188, перечисленных в табл. 2, и степенью образования частиц. Степень образования частиц (%) рассчитывают для каждого образца путем деления количества контейнеров, в которых образовались частицы, на общее количество контейнеров, подвергнутых тестированию, и умножения на 100. Кроме того, поскольку как статические условия хранения при 25°C, так и статические условия хранения при 40°C представляют собой напряжение, вызванное повышенной температурой, а образованные белковые частицы в основном состоят из комплексов белка и полидиметилсилоксана, было сделано заключение, что частицы образуются в соответствии с эквивалентным путем образования частиц, и степень образования частиц (%), таким образом, рассчитывалась путем их добавления в качестве  
15        результата теплового напряжения.  
20

      Для образцов, подвергавшихся статическому хранению при 5°C и периодическому механическому напряжению, большую часть составляли нерастворимые посторонние вещества, представляющие собой только белок, которые, как считалось, образовались по другому пути формирования частиц, а не в условиях теплового напряжения, и поэтому они анализировались отдельно как результат механического напряжения.  
25

      В результате обнаружена корреляция между соотношением поздних элюатов и степенью образования частиц в условиях теплового напряжения для mAb1 (фиг. 7). Также наблюдается корреляция между соотношением поздних элюатов и скоростью образования частиц в условиях теплового напряжения и механического напряжения для mAb2 (фиг. 8 и левый рисунок на фиг. 10). Слабую корреляцию наблюдали в условиях механического напряжения для mAb1 (левый рисунок на фиг. 9).  
30

Эта корреляционная диаграмма показывает, что чем выше значение соотношения поздних элюатов, т.е. чем больше используют видов РХ188 с длинными блоками РРО, тем больше можно снизить образование частиц в составах mAb1 и mAb2. Поскольку пропорция поздних элюатов хорошо коррелирует со значением поверхностного натяжения, как показано в примере 3, можно сделать следующее заключение: образование частиц в составах mAb1 и mAb2 можно снизить, используя поверхностно-активное вещество, которое может снизить поверхностное натяжение. Показано, что это не зависит от вида поверхностно-активного вещества, так как даже с PS80, который является другим видом поверхностно-активного вещества по сравнению с РХ188, значение поверхностного натяжения водного раствора PS80 было низким и степень образования частиц была низкой. Кроме того, получены результаты, в которых степень образования частиц значительно отличалась при значениях поверхностного натяжения в диапазоне 50-53 мН/м, что предполагает, что в этом диапазоне существует порог для увеличения и уменьшения образования частиц в составах mAb1 и mAb2.

Пример 9. Анализ корреляции между степенью ненасыщенности РХ188 и степенью образования частиц

Анализируют в условиях механического напряжения корреляцию степени формирования частиц не только с соотношением поздних элюатов, но и со степенью ненасыщенности. В результате обнаружена определенная степень корреляции: чем ниже степень ненасыщенности, т.е. чем меньше двублочных соединений (соединений РЕО-РРО) в продукте, тем ниже степень образования частиц (средняя цифра на фиг. 9 и средняя цифра на фиг. 10). В частности, для РХ(7), который показывает степень ненасыщенности ниже нижнего предела текущего стандарта USP для ненасыщенности РХ188 (0,018 мЭкв/г), образование белковых посторонних веществ было полностью подавлено как для mAb1, так и для mAb2.

Кроме того, при проведении множественного регрессионного анализа с использованием двух параметров: соотношения поздних элюатов и степени ненасыщенности, наблюдают увеличение коэффициента корреляции, степень которого была особенно значительна для mAb2. (правый рисунок на фиг. 9 и правый рисунок на фиг. 10).

Пример 10. Оценка HMWS, полученных в каждом составе

Для оценки влияния поверхностно-активных веществ на формирование агрегатов, полученных в составе из антител (HMWS), количество HMWS, образованных в составах с использованием семи типов PX188 и одного типа PS80, перечисленных в табл. 2, оценивали с помощью эксклюзионной хроматографии. Оценивали условия статического хранения при 5°C, статического хранения при 25°C, статического хранения при 40°C и статического хранения при 5°C с применением периодического механического напряжения, каждое из них до, через 3 месяца и через 6 месяцев. Однако, поскольку визуальная оценка не проводилась через 6 месяцев в условиях статического хранения при 5°C с применением периодического падения и вибрации для mAb2, оценка HMWS также не проводилась.

В качестве системы ВЭЖХ используют жидкостный хроматограф Alliance 2695 (фирма Waters), оснащенный детектором 2489 УФ/видимого диапазона (фирма Waters), а для сбора и анализа данных используют программное обеспечение Empower 3 (фирма Waters). Для разделения используют колонку TSKgel G3000SWXL (250 Å, 5 мкм, 300 x 7,8 мм; фирма Tosoh), установленную на температуру  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ . Скорость потока фиксируют на уровне 0,2 мл/мин, в качестве подвижной фазы используют 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 300 мМ  $\text{NaCl}$  и 0,5 мг/мл  $\text{NaN}_3$  (рН 7,0), скорость потока фиксируют на уровне 0,5 мл/мин. Каждый раствор антитела разбавляют раствором подвижной фазы до концентрации антитела 1 мг/мл, из которых 60 мкл вводят в систему ВЭЖХ. Процент HMWS определяют как отношение площади пика HMWS с временем выхода в районе 14,5 мин, к общей площади пика в диапазоне интегрирования площади пика (10-24 мин) и рассчитывают по хроматограмме каждого образца.

Расчетные величины HMWS показаны в табл. 7.

Таблица 7. Количество НМWS, сформированных в составах mAb1 и mAb2

mAb	состав	Начальная точка	5°C		25°C		40°C		5°C +	
			3 месяца	6 месяцев						
mAb1	PX(1)	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	1.3	3.0	0.2	0.2
	PX(2)	0.0	0.2	0.2	0.3	0.4	1.4	3.3	0.2	0.2
	PX(3)	0.0	0.2	0.1	0.3	0.4	1.4	3.5	0.2	0.2
	PX(4)	0.0	0.2	0.2	0.3	0.4	1.4	3.5	0.2	0.2
	PX(5)	0.0	0.2	0.2	0.3	0.4	1.4	3.5	0.2	0.2
	PX(6)	0.0	0.2	0.2	0.3	0.4	1.3	3.5	0.2	0.2
	PX(7)	0.1	0.2	0.1	0.3	0.4	1.4	3.5	0.2	0.2
	PS80	0.1	0.2	0.1	0.3	0.3	1.2	2.9	0.2	0.2
mAb2	PX(1)	0.3	0.3	0.4	0.7	0.8	2.2	4.8	0.4	
	PX(2)	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	2.3	4.6	0.4	
	PX(3)	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	2.1	4.9	0.4	
	PX(4)	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	2.0	5.3	0.4	
	PX(5)	0.3	0.4	0.4	0.7	0.8	2.2	5.3	0.4	
	PX(6)	0.3	0.4	0.4	0.6	0.8	1.9	5.3	0.4	
	PX(7)	0.3	0.3	0.4	0.6	0.8	1.8	5.3	0.4	
	PS80	0.3	0.3	0.3	0.5	0.6	1.2	2.6	0.4	

Статические условия при 5°C и статические условия хранения при 5°C с применением периодического механического напряжения показывает почти эквивалентные количества НМWS, и не наблюдают значительного увеличения НМWS или различий между образцами. Увеличение количества НМWS  
5 наблюдают при статических условиях при 25°C и статических условиях при 40°C по сравнению со статическими условиями при 5°C, но значительных различий между образцами не наблюдают. В условиях теплового стресса PS80 показывает несколько более низкие значения, чем группа образцов PX188, но нет никакой существенной разницы в пропорции образования частиц по  
10 сравнению с PX188 с относительно низкими значениями поверхностного натяжения (например, PX(1) и PX(4)), что позволяет предположить, что количество образующегося НМWS не играет роли в снижении образования частиц в составах mAb1 и mAb2, и, кроме того, защитная способность  
15 различных поверхностно-активных веществ от напряжений на границе раздела газ-жидкость, поверхности контейнера и поверхности силиконового масла (ПДМС) влияет на пропорцию образуемых частиц (фиг. 11). На левой стороне фиг. 11 отображен случай, когда поверхность соприкосновения достаточно защищена поверхностно-активным веществом, а на правой стороне фиг. 9  
20 отображен случай, когда защита недостаточна.

20 Пример 11. Измерение значений поверхностного натяжения при низкой концентрации PX188

Из семи типов PX188, перечисленных в табл. 2, значения поверхностного натяжения водных растворов каждого поверхностно-активного вещества, растворенного в сверхчистой воде в концентрации 0,01 мг/мл, измерены для  
25 PX(3), PX(6) и PX(7). Измерения методом Wilhelmy с использованием поверхностного тензиометра (Force Tensiometer K100C, фирма Kruss) с платиновой пластиной проводят при температуре 20-25°C. В качестве параметров измерения для K100C устанавливают скорость обнаружения 6 мм/мин, чувствительность обнаружения 0,005 г и глубину погружения 2 мм, а  
30 значения поверхностного натяжения от начала измерения до 600 сек получают с интервалом 60 сек (фиг. 12). Стекланный контейнер с раствором поверхностно-активного вещества, в который погружают платиновую пластину, промывают многократно изопропиловым спиртом, а затем сверхчистой водой после каждого

измерения. Платиновую пластину также промывают изопропиловым спиртом, а затем сверхчистой водой, а затем очищают, нагревая ее до красна спиртовкой после каждого измерения.

5 Значения поверхностного натяжения водных растворов различных РХ188 демонстрируют такое же поведение, как и при измерении значений  
поверхностного натяжения водных растворов РХ188, растворенных в  
сверхчистой воде при концентрации 0,5 мг/мл, и поэтому значения при 600 сек  
(55,7 мН/м для РХ(3), 56,4 мН/м для РХ(6) и 55,3 мН/м для РХ(7)) приняты в  
качестве значений поверхностного натяжения различных растворов  
10 поверхностно-активных веществ. Степень различий в значениях поверхностного  
натяжения РХ188, измеренных при 600 сек, аналогичны примеру 2, и разницу в  
способности каждого РХ188 активировать поверхность можно оценить даже при  
концентрации РХ188 ниже 0,5 мг/мл.

Пример 12. Компонентный анализ полоксамера 237 (РХ237) методом  
15 обращенно-фазовой хроматографии

Результаты компонентного анализа полоксамера 237 (РХ237) методом  
обращенно-фазовой хроматографии с использованием той же процедуры, что и в  
примере 1, показаны на фиг. 13 ниже. Для РХ237 показано, что все пики  
появляются через 17 минут, за исключением области пика с выходом на 1,5 мин  
20 после старта.

Пример 13. Измерение значения поверхностного натяжения РХ237

Измерены значения поверхностного натяжения водного раствора РХ237,  
растворенного в сверхчистой воде (вода Milli-Q) до 0,05 мг/мл. Измерения  
методом Wilhelmy с использованием поверхностного тензиометра (Force  
25 Tensiometer K100C, фирма Kruss) с платиновой пластиной проводят при  
температуре 20-25°C. В качестве параметров измерения для K100C  
устанавливают скорость обнаружения 6 мм/мин, чувствительность обнаружения  
0,005 г и глубину погружения 2 мм, а значения поверхностного натяжения от  
начала измерения до 600 сек получают с интервалом 60 сек (фиг. 14).  
30 Стекланный контейнер с раствором поверхностно-активного вещества, в  
который погружена платиновая пластина, промывают многократно  
изопропиловым спиртом, а затем сверхчистой водой после каждого измерения.  
Платиновую пластину также промывают изопропиловым спиртом и затем

сверхчистой водой, после чего очищают, нагревая ее до красна спиртовкой после каждого измерения.

5 Значения поверхностного натяжения водного раствора РХ237 с концентрацией 0,5 мг/мл проявляются так же, как и при измерении значений поверхностного натяжения водных растворов РХ188, растворенного в сверхчистой воде при концентрации 0,5 мг/мл, и поэтому значение через 600 секунд (45,9 мН/м) принимают в качестве значения поверхностного натяжения водного раствора РХ237. Приняты значения поверхностного натяжения водного раствора РХ188 с концентрацией 0,5 мг/мл и значения через 600 секунд.

10 Значения поверхностного натяжения водного раствора РХ237 ниже значений поверхностного натяжения любого из водных растворов РХ188, перечисленных в табл. 2, что позволяет сделать заключение, что способность активировать поверхность у РХ237 выше, чем у РХ188.

15 Пример 14. Подготовка образца для оценки визуально обнаруживаемых частиц

Для исследования влияния РХ237 на образование визуально обнаруживаемых частиц, используют РХ237 и, в качестве контроля, тип РХ(3) из РХ188, перечисленных в табл. 2, для исследования образования частиц в одном составе с mAb. Использованным mAb было mAb1 (эмицизумаб, IgG4, гуманизированное биспецифическое моноклональное антитело к фактору свертывания крови IXa/X), произведенное и очищенное фирмой Chugai Pharmaceutical.

25 Для образца mAb1 водный раствор, содержащий 150 мг/мл mAb1, 20 мМ гистидина, 150 мМ аргинина, аспарагиновую кислоту (q.s.) и 0,5 мг/мл РХ188 или РХ237, доводят до pH 6,0 и по 1 мл помещают во флаконы (стеклянные флаконы объемом 3 мл, обработанные серой, фирма MURASE GLASS). Полученные образцы визуально проверяют для исключения образцов, которые содержат видимые посторонние объекты на этапе получения образца.

30 Шестьдесят флаконов с mAb1 для каждого образца предоставлены группе, в которой образцы, в которых после визуального осмотра не было обнаружено видимых посторонних объектов, визуально осмотрены после того, как их оставили постоять при температуре 25°C.

Пример 15. Образование частиц, оставленных при температуре 25°C

Визуальный осмотр образцов проводят после того, как их выдерживают и хранят в течение 6 месяцев при температуре 25°C в соответствии с методом визуального осмотра 1. Для частиц, обнаруженных при визуальном осмотре, идентификацию их композиции методом раман-спектроскопии проводят с использованием микроскопа с раман-визуализацией (DXR2xi, фирма Thermo scientific) в соответствии с методом идентификации состава визуально обнаруживаемых частиц методом раман-спектроскопии.

Количество контейнеров, содержащих белковые частицы, подсчитывают для образцов, оставленных на хранение в течение 6 месяцев при температуре 25°C, что показано в табл. 8. Показано, что когда поверхностно-активное вещество, содержащееся в составе, является РХ237, скорость образования частиц ниже, чем у РХ(3).

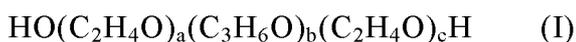
Таблица 8.

	Первоначально	Через 6 месяцев при 25°C
mAb1 приготовленное с РХ(3)	0/60	5/60 (Белок-ПДМС ВЧ)
mAb1 приготовленное с РХ237	0/60	0/60

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (поллоксамер),

где поллоксамер представлен формулой I:



10 в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

a, b и c означают средние значения по всему поллоксамеру,

и

15 площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

20 (2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

25 От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

30 От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности

нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

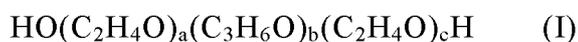
(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

5

2. Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (полоксамер),

10

где полоксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

15

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и

площадь пика после 17-минутного элюирования составляет 3% или более от общей площади пика через 1,5 минуты проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

20

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка для ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

25

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

30

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин

(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

3. Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль (полоксамер),

где полоксамер представлен формулой I:

15  $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_c\text{H}$  (I)

в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

и

20 полоксамер включает молекулы полоксамера, содержащие 34 или более  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) или более от общего количества полоксамера.

4. Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и поверхностно-активное вещество,

30 где поверхностно-активное вещество представляет собой поверхностно-активное вещество, в котором водный раствор, содержащий поверхностно-активное вещество в концентрации 0,5 мг/мл, имеет поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее.

5. Фармацевтический состав по п. 4, где поверхностно-активное вещество выбрано из поллоксамера или сложного эфира жирной кислоты и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбата).

5 6. Фармацевтический состав по п. 4 или п. 5, где поверхностно-активное вещество представляет собой поллоксамер, представленный формулой I по п. 1.

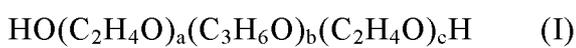
7. Фармацевтический состав по любому из п.п. 4-6, где поверхностно-активное вещество представлено полисорбатом 80.

10

8. Фармацевтический состав, содержащий водный раствор, включающий моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, и полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль

15 (поллоксамер),

где поллоксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

20 a, b и c означают средние значения по всему поллоксамеру,

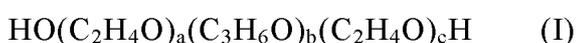
и

степень ненасыщенности поллоксамера составляет менее 0,018 мЭкв/г.

9. Способ уменьшения образования частиц в водном растворе, в  
25 фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего H-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

30 включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (поллоксамера) в водный раствор,

где поллоксамер представлен формулой I:



в которой а и с независимо означают целое число, выбранное из чисел 75-85;

в означает число, выбранное из чисел 22-33; и

а, b и с означают средние значения по всему полосукамеру,

5 и

площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

10 (1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

15 (3) Программа градиента элюирования

От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

20 От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин

25 (5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полосукамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

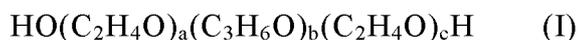
30

10. Способ уменьшения образования частиц в водном растворе, в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и

антитела, имеющего H-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (полоксамера) в водный раствор,

5 где полоксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

a, b и c означают средние значения по всему полоксамеру,

10 и площадь пика после элюирования в течение 17 минут составляет 3% или более от общей площади пика через 1,5 минуты проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, определенных ниже:

[Условия осуществления высокоэффективной жидкостной хроматографии]

(1) Колонка: колонка ВЭЖХ, заполненная макропористым стирол-  
15 дивинилбензолом (1000 Å, 5 мкм, 50 × 2,1 мм)

(2) Подвижная фаза:

Подвижная фаза А: сверхчистая вода

Подвижная фаза Б: ацетонитрил

(3) Программа градиента элюирования

20 От 0 мин до 16,0 мин: подвижная фаза Б от 58% до 64%

От 16,0 мин до 18,5 мин: подвижная фаза Б от 64% до 90%

От 18,5 мин до 21,5 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 90%

От 21,5 мин до 23,5 мин: подвижная фаза Б от 90% до 100%

От 23,5 мин до 30,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 100%

25 От 30,0 мин до 30,1 мин: подвижная фаза Б от 100% до 58%

От 30,1 мин до 40,0 мин: подвижная фаза Б, фиксированная на 58%

(4) Скорость потока: 0,2 мл/мин

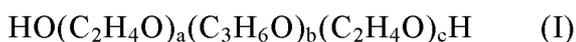
(5) Метод обнаружения: обнаружение рассеяния света в результате  
испарения (температура дрейфовой трубки:  $50 \pm 25^\circ\text{C}$ , уровень мощности  
30 нагрева распылителя: 75%, коэффициент усиления: 250, давление газа: 20 фунтов на квадратный дюйм)

(6) Температура колонки:  $65 \pm 5^\circ\text{C}$

(7) Концентрация полоксамера (в сверхчистой воде): 0,5 мг/мл.

11. Способ уменьшения образования частиц в водном растворе, в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, включающий добавление полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоля (поллоксамера) в водный раствор,

где поллоксамер представлен формулой I:



в которой a и c независимо означают число, выбранное из чисел 75-85;

b означает число, выбранное из чисел 22-33; и

a, b и c означают средние значения по всему поллоксамеру,

и поллоксамер включает молекулы поллоксамера, содержащие 34 или более  $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$  в молекуле в количестве 3% (мас./мас.) от общего количества поллоксамера.

12. Способ уменьшения образования частиц в водном растворе, в фармацевтическом составе, содержащем моноклональное антитело, выбранное из антитела, имеющего Н-цепи SEQ ID NO: 1 и 2 и L-цепь SEQ ID NO: 3, и антитела, имеющего Н-цепь SEQ ID NO: 4 и L-цепь SEQ ID NO: 5, в водном растворе,

включающий добавление в водный раствор поверхностно-активного вещества, имеющего поверхностное натяжение 52,3 мН/м или менее в водном растворе поверхностно-активного вещества в концентрации 0,5 мг/мл.

13. Способ по п. 12, где поверхностно-активное вещество выбрано из поллоксамера или сложного эфира жирной кислоты и полиоксиэтиленсорбитана (полисорбата).

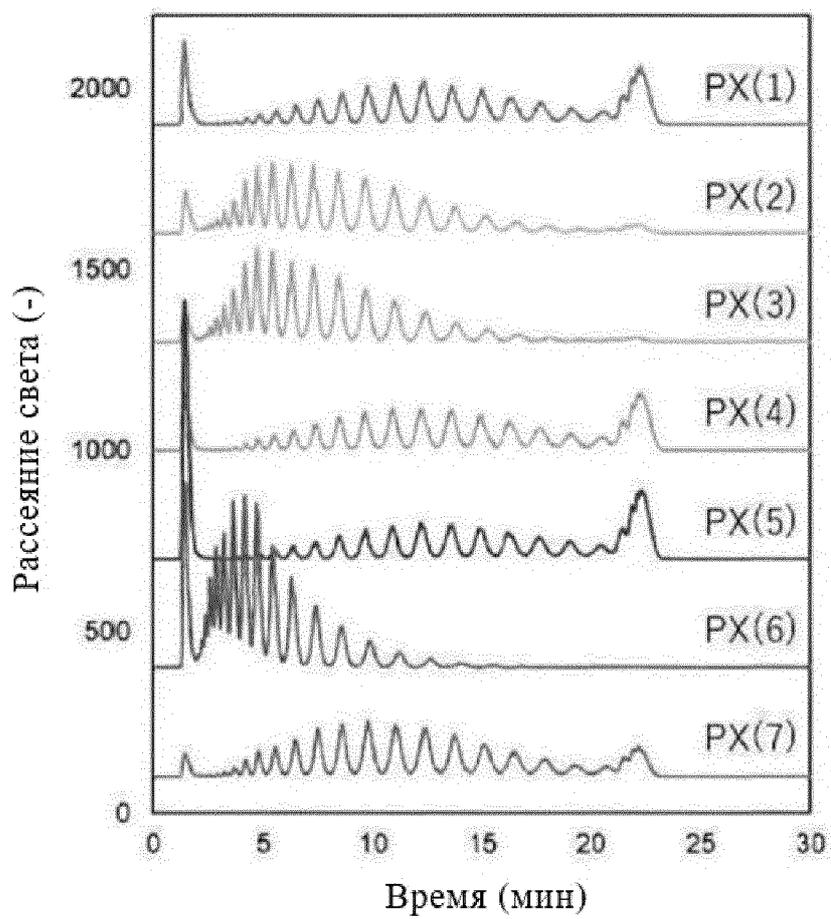
14. Способ по п. 12 или п. 13, где поверхностно-активное вещество представляет собой поллоксамер, представленный формулой I согласно п. 1.

15. Способ по любому из п.п. 12-14, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

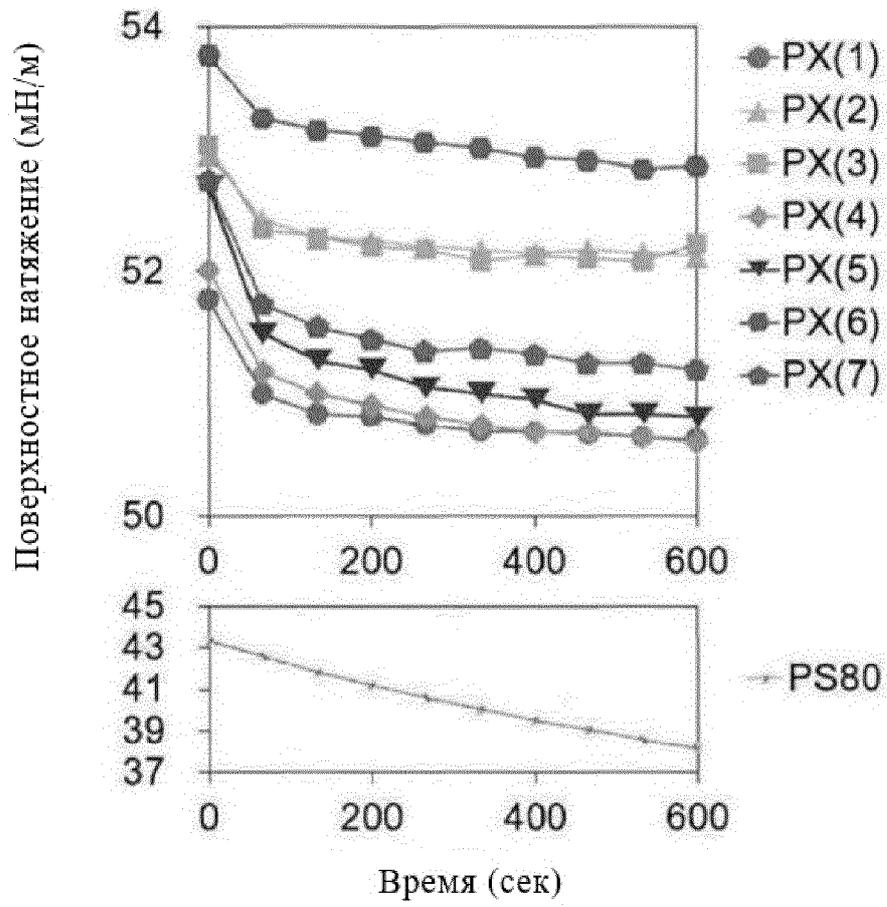
16. Способ по любому из п.п. 9-15, где частицы образованы из белка.

5

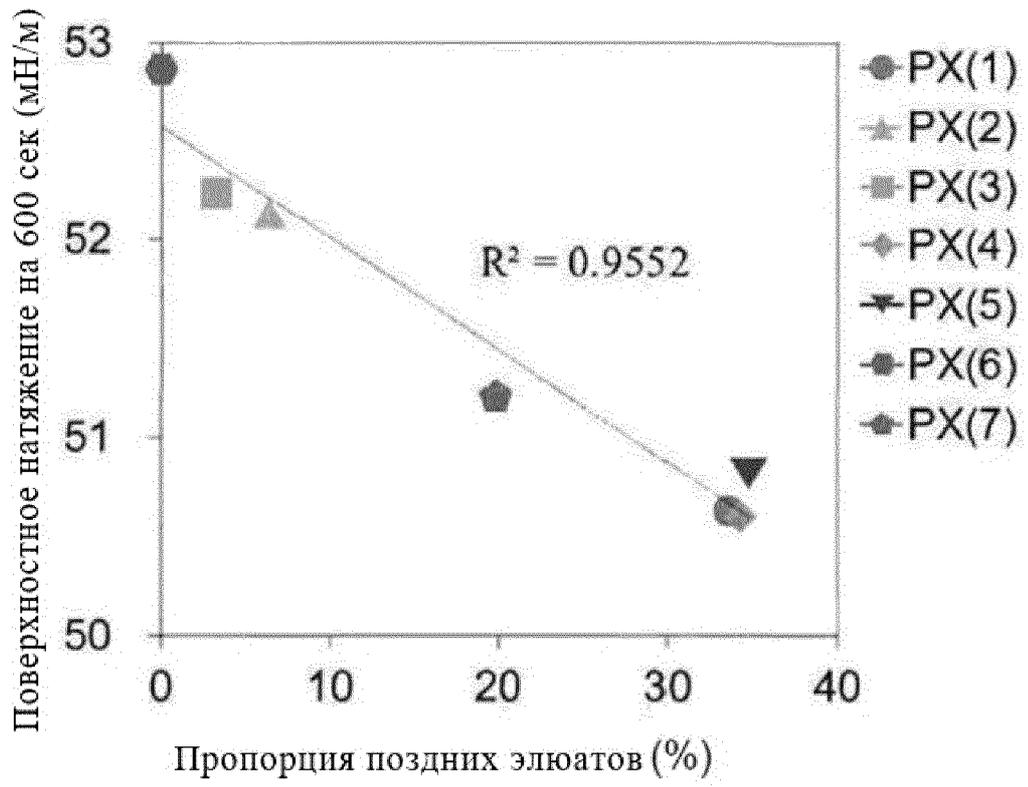
17. Способ по любому из п.п. 9-16, где диаметр частиц составляет 40 мкм или более.



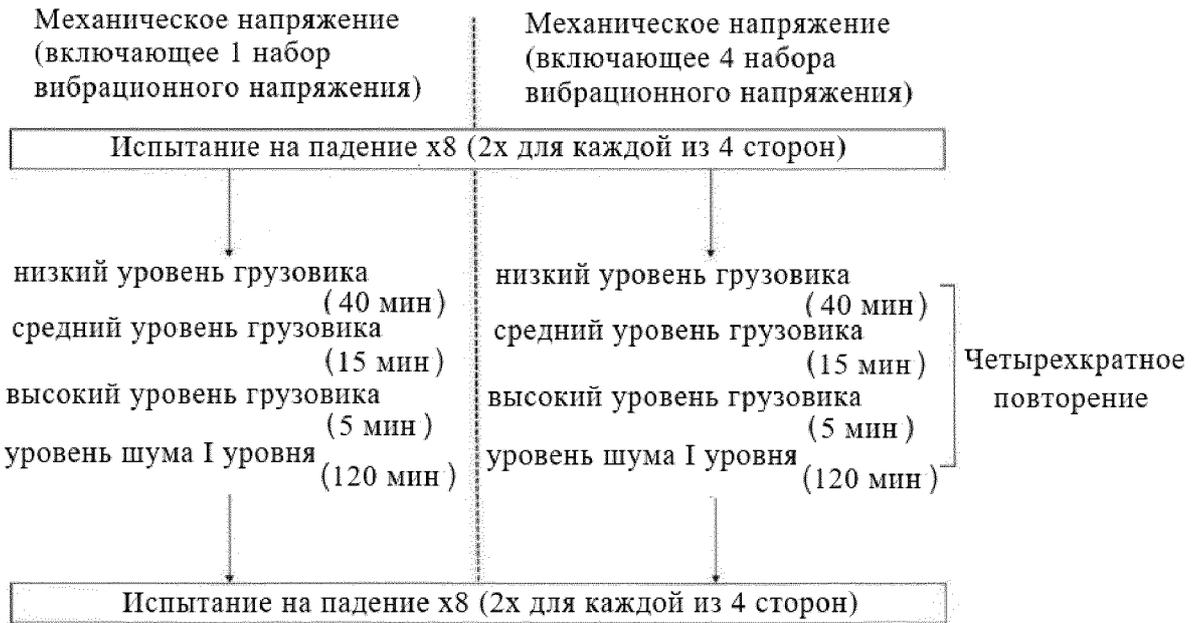
Фигура 1.



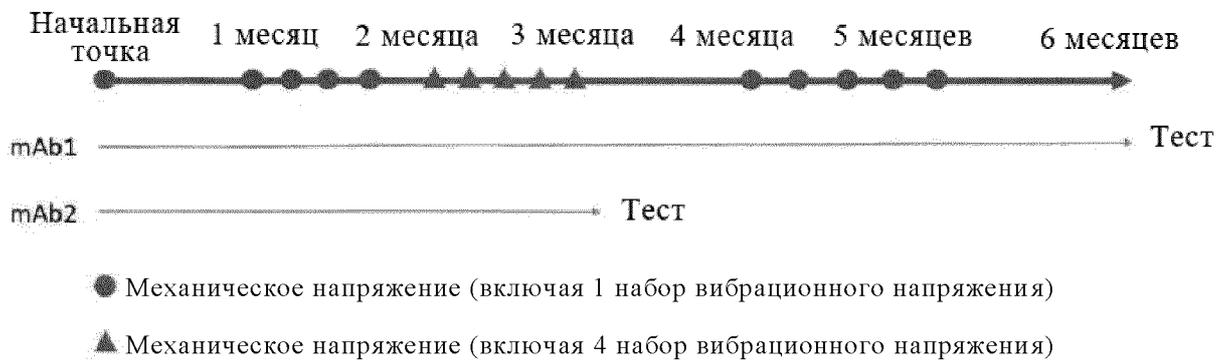
Фигура 2.



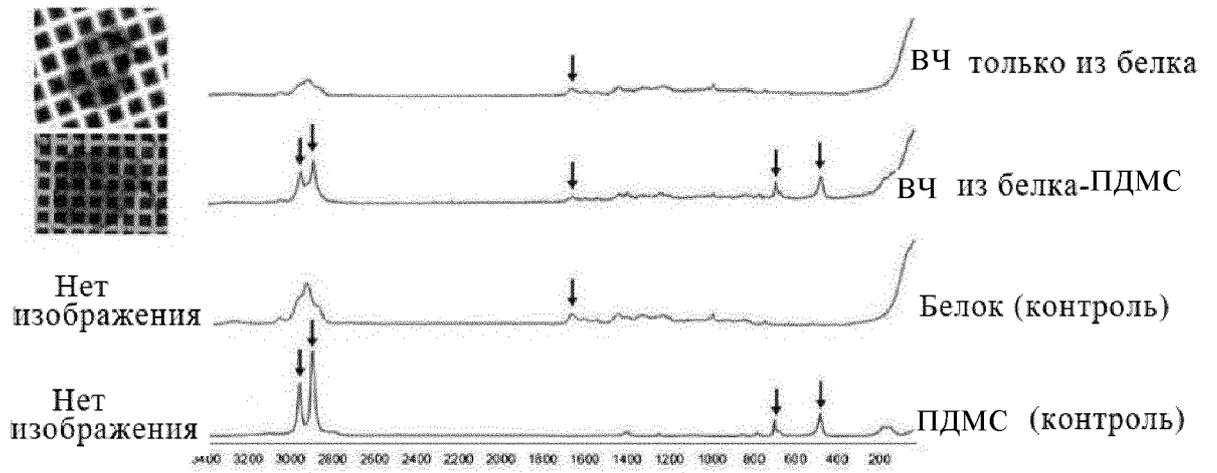
Фигура 3.



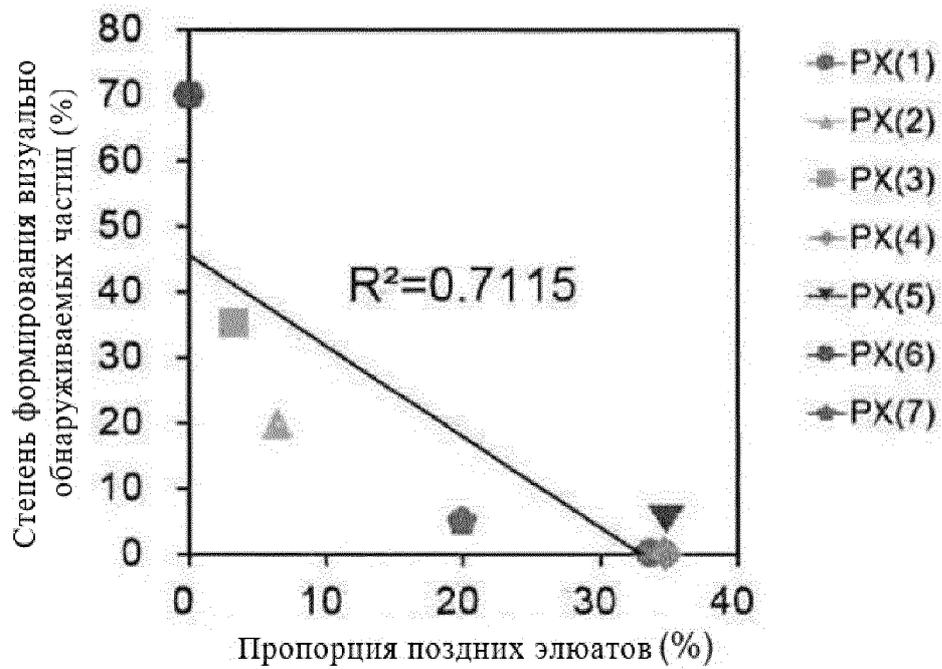
Фигура 4.



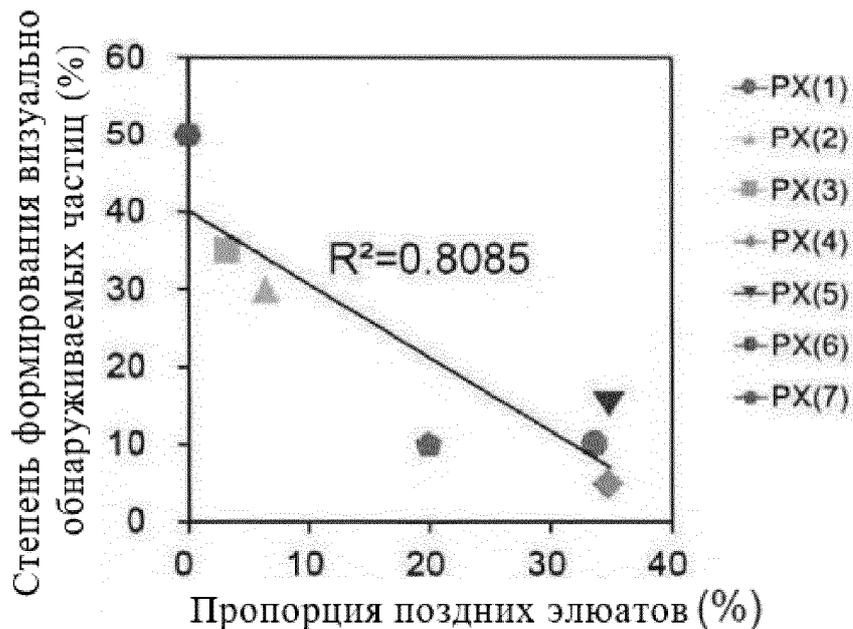
Фигура 5.



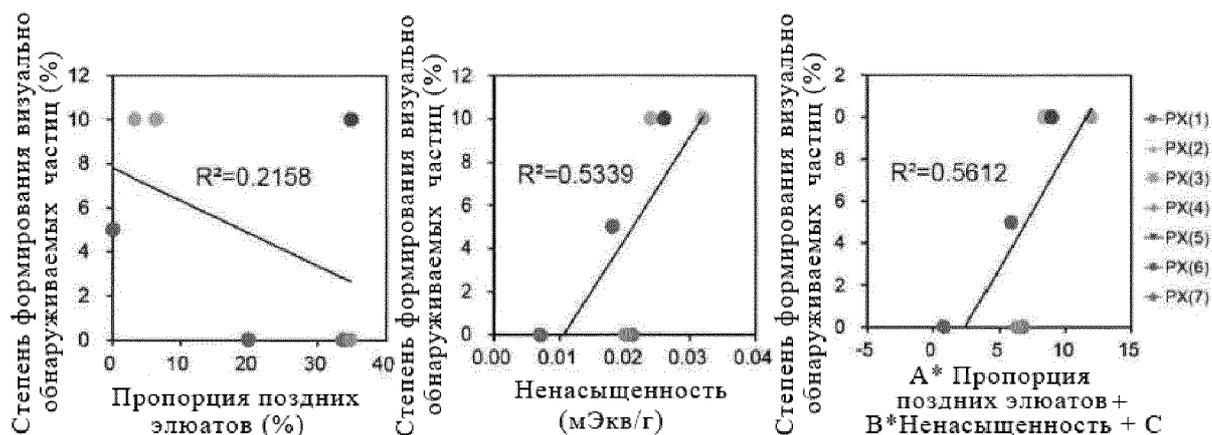
Фигура 6.



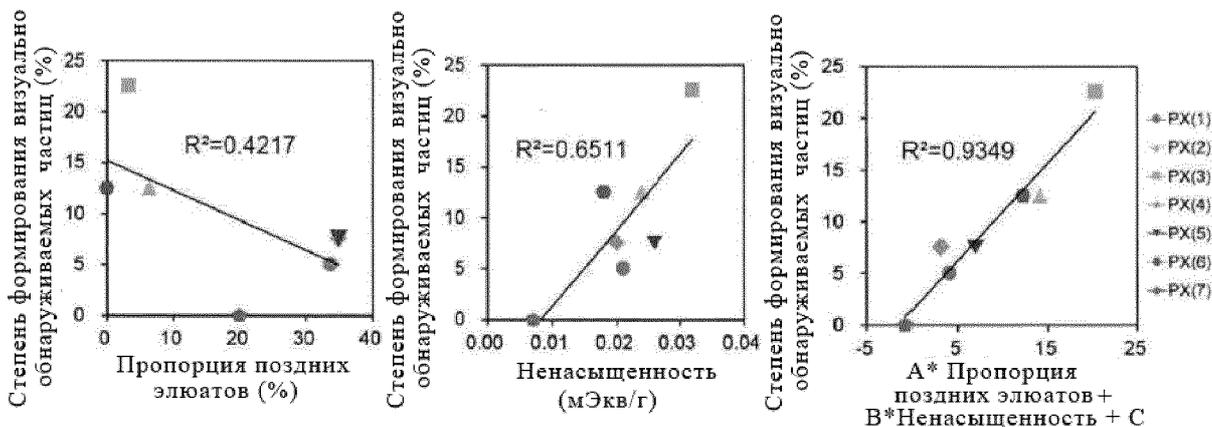
Фигура 7.



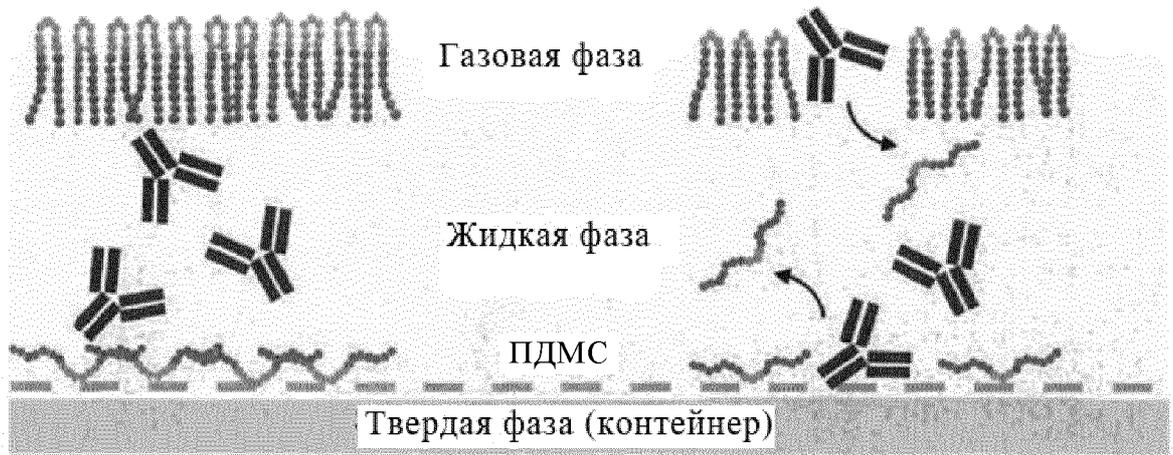
Фигура 8.



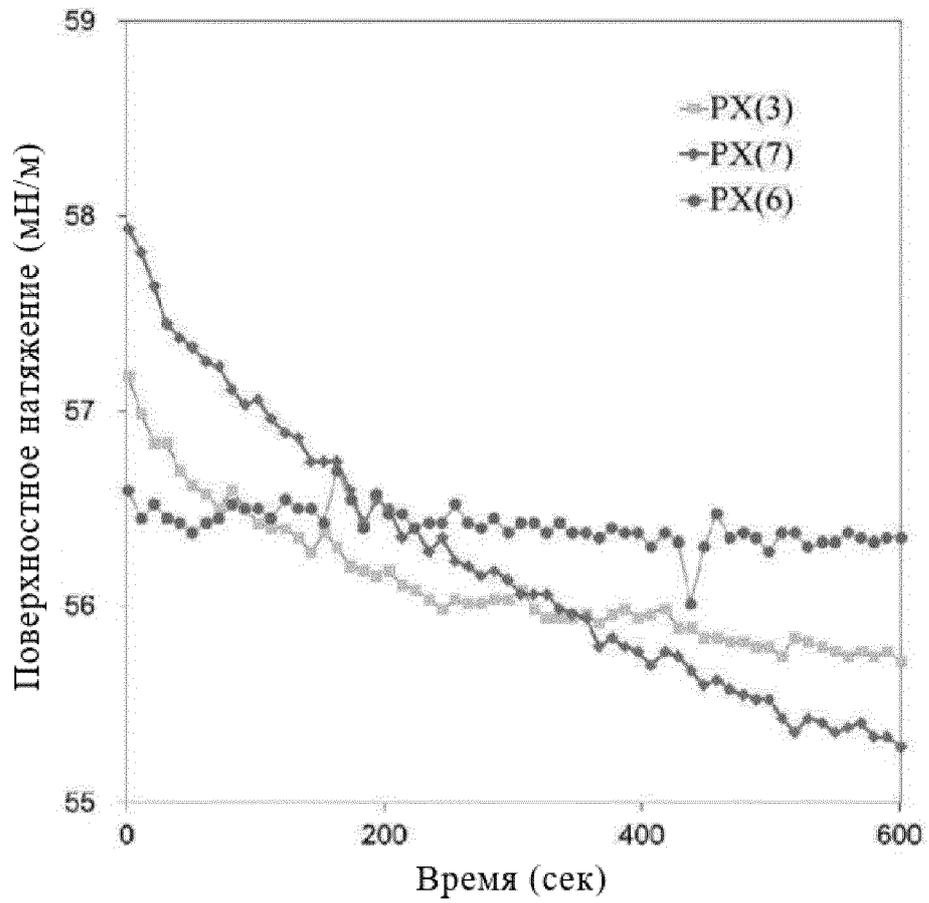
Фигура 9.



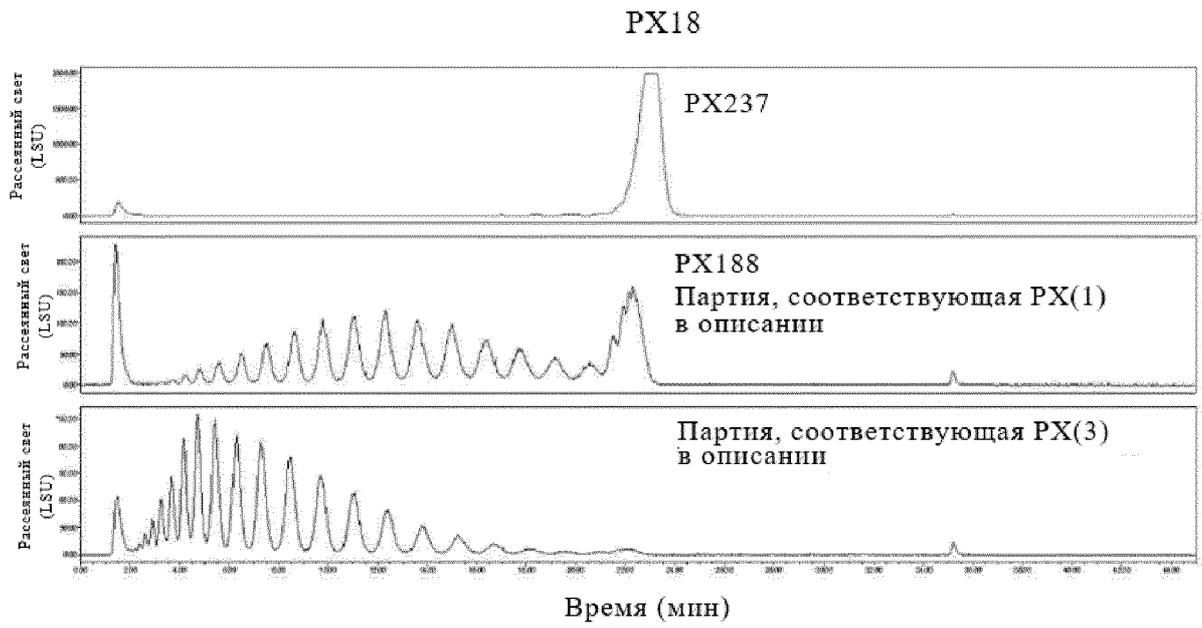
Фигура 10.



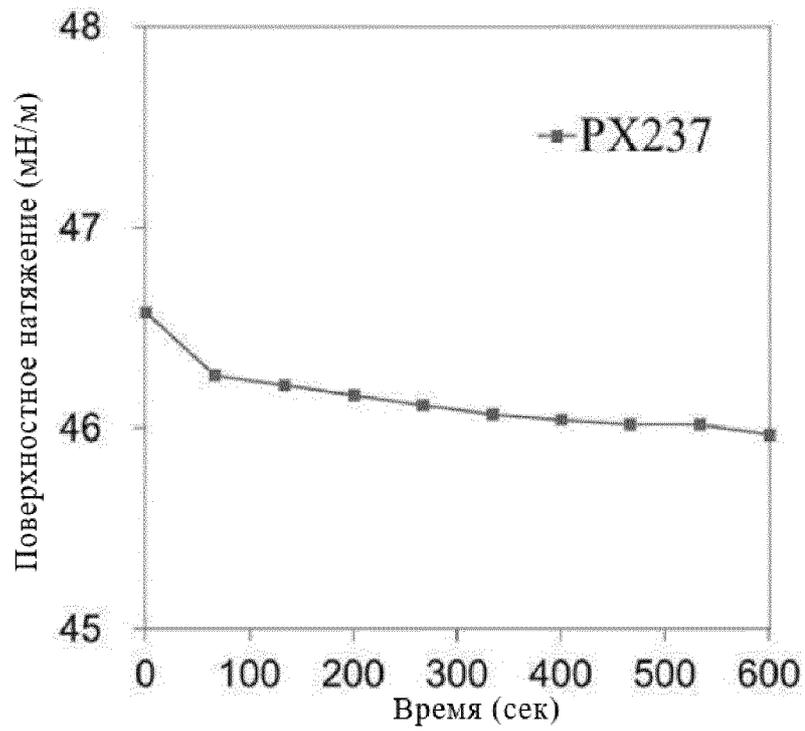
Фигура 11.



Фигура 12.



Фигура 13.



Фигура 14.