



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **120164**

(13) **C2**

(51) МПК

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2015 11618</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Карайон Софі (FR), Буссіф Отман (FR)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>29.04.2014</b>	(73) Власник(и):	<b>САНОФІ,</b> 54 rue la Boétie, F-75008 Paris, France (FR)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.10.2019</b>	(74) Представник:	<b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/816,899, 14305160.5</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2012125775 A1, 20.09.2012 WO 2009052081 A2, 23.04.2009 US 2012121580 A1, 17.05.2012
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>29.04.2013, 05.02.2014</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, EP</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>11.04.2016, Бюл.№ 7</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.10.2019, Бюл.№ 20</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/EP2014/058733, 29.04.2014</b>		

## (54) СТАБІЛЬНИЙ СКЛАД НА ОСНОВІ БІСПЕЦИФІЧНОГО АНТИТІЛА ДО IL-4/IL-13

### (57) Реферат:

Винахід стосується стабільного складу на основі біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13 та буферної системи, де рН складу становить приблизно рН 7, і де склад характеризується низькою концентрацією солей з метою зниження іонної сили складу.

UA 120164 C2



## Галузь винаходу

Даний винахід передбачає стабільні фармацевтичні склади на основі антитіл, у тому числі ліофілізовані склади, що містять біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 та буферну систему, де рН складу становить приблизно рН 7, і де склад характеризується низькою концентрацією солей з метою зниження іонної сили складу. Склади необов'язково можуть додатково містити неіоногенну поверхнево-активну речовину, цукор та/або неіоногенний стабілізатор. Склади можна застосовувати при лікуванні різних захворювань.

## Передумови винаходу

Як IL-4, так і IL-13 є терапевтично важливими цитокінами, що обумовлено їхніми біологічними функціями, та відіграють критично важливі ролі в багатьох захворюваннях, включаючи астму (Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vo. 5, 161-166). Було показано, що IL-4 здатний пригнічувати аутоімунні захворювання, і як IL-4, так і IL-13 продемонстрували можливість посилення протипухлинних імунних відповідей. Оскільки обидва цитокіни залучені в патогенез алергічних захворювань, інгібітори цих цитокінів можуть забезпечувати терапевтичні ефекти.

З метою розробки фармацевтичного складу, що містить біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13, який підходить для підшкірного введення, концентрацію антитіла необхідно збільшити до приблизно 100 мг/мл або більше. Однак, при таких високих концентраціях може виникнути багато ускладнень, у тому числі підвищення в'язкості, зсув рН, зміна кольору розчину та утворення видимих та не видимих неозброєним оком частинок. Складання антитіла додатково ускладнюється тим, що воно досить схильне до агрегації при високих концентраціях. У той час як типові антитіла у нормі утворюють менше 5 % високомолекулярних агрегатів (HMW) протягом періоду часу 4 років при 5 °C, біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 утворює HMW при швидкості 0,5-1 % за годину при 25 °C та при швидкості 0,1 % за годину при 5 °C. Більш того, це антитіло має настільки сильну схильність до агрегації, що його не можна скласти в рідкій формі в цільовому діапазоні концентрацій. Нарешті, біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 має надзвичайно низьку ізоелектричну точку, що ускладнює його складання у зв'язку з проблемами розчинності. Наприклад, біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 має ізоелектричну точку від 5,8 до 6,2, тоді як більшість антитіл мають ізоелектричну точку від 8 до 10.

Відповідно, існує необхідність у покращених і стабільних фармацевтичних складах, у яких ці ускладнення можуть бути усунуті.

## Короткий опис винаходу

Для задоволення цих та інших потреб у даному документі передбачені високостабільні склади на основі біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13. Високостабільні склади на основі біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13 були несподівано виявлені у формі рідин та ліофілізованих порошків, що містять біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 і буферну систему, де рН складу становить приблизно рН 7, і де склад характеризується низькою концентрацією солей з метою зниження іонної сили складу. Склади необов'язково можуть додатково містити неіоногенну поверхнево-активну речовину, цукор та/або неіоногенний стабілізатор. Дані склади покращені відносно традиційних складів, у яких підвищення концентрації антитіла в складі часто приводить до утворення молекулярних агрегатів (HMW) антитіла та утворенню видимих і не видимих неозброєним оком частинок. Зокрема, склади за даним винаходом проявляють високу стабільність відносно видимих частинок, не видимих неозброєним оком частинок, низькомолекулярних білків і високомолекулярних білків.

У варіанті здійснення даного винаходу передбачений стабільний склад на основі антитіла, що містить: біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент, що містять легкий ланцюг формули VL1-лінкер-VL2 та важкий ланцюг формули VH1-лінкер-VH2, де VL1 і VH1 утворюють антиген-зв'язуючий домен для IL-13, а VL2 і VH2 утворюють антиген-зв'язуючий домен для IL-4; і буферну систему, що підходить для підтримки рН складу при приблизно рН 7; і де склад характеризується низькою концентрацією солей з метою зниження іонної сили складу.

В конкретних варіантах здійснення VL1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 1; VH1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 2; VL2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 3; а VH2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 4 або 5. В альтернативних конкретних варіантах здійснення VL1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; VH1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; VL2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; а VH2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 або 5.

В конкретних варіантах здійснення легкий ланцюг має формулу N-VL1-лінкер-VL2-CL, де CL являє собою константний домен легкого ланцюга антитіла, і де важкий ланцюг має формулу N-VH1-лінкер-VH2-CH1-CH2-CH3, де CH2-CH3 відповідає Fc-домену антитіла. В конкретних

варіантах здійснення лінкер містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

В конкретних варіантах здійснення антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент додатково містять домен константної області. В конкретних варіантах здійснення домен константної області обраний з групи, що складається з CH1, CH2, CH3 і CL.

5 В конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент являють собою гуманізоване біспецифічне антитіло IgG4 або його антиген-зв'язуючий фрагмент.

В конкретних варіантах здійснення концентрація антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента становить приблизно 100 мг/мл.

10 У певних варіантах здійснення даного винаходу буферна система містить щонайменше два буфери. В конкретних варіантах здійснення концентрація буферної системи становить приблизно 10 мМ. В конкретних варіантах здійснення буферна система містить Tris-буфер і фосфатний буфер. В конкретних варіантах здійснення концентрація Tris-буфера становить приблизно 3,7 мМ. В конкретних варіантах здійснення концентрація фосфатного буфера становить приблизно 6,3 мМ. В конкретних варіантах здійснення концентрація Tris-буфера становить приблизно 3,7 мМ, а концентрація фосфатного буфера становить приблизно 6,3 мМ.

У певних варіантах здійснення даного винаходу склад додатково містить неіоногенну поверхнево-активну речовину. В конкретних варіантах здійснення концентрація неіоногенної поверхнево-активної речовини становить від приблизно 0,05 % до приблизно 0,2 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення неіоногенна поверхнево-активна речовина являє собою полісорбат. В конкретних варіантах здійснення полісорбат являє собою полісорбат 80. В конкретних варіантах здійснення концентрація полісорбату 80 становить від приблизно 0,05 % до приблизно 0,2 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення концентрація полісорбату 80 становить приблизно 0,2 % (вага/об'єм).

25 У певних варіантах здійснення даного винаходу склад додатково містить цукор. В конкретних варіантах здійснення концентрація цукру становить приблизно 5 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення цукор являє собою дисахарид. В конкретних варіантах здійснення дисахарид являє собою цукрозу. В конкретних варіантах здійснення концентрація цукрози становить приблизно 5 % (вага/об'єм).

30 У певних варіантах здійснення даного винаходу склад додатково містить неіоногенний стабілізатор. В конкретних варіантах здійснення концентрація неіоногенного стабілізатора становить від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення неіоногенний стабілізатор являє собою або амінокислоту, або цукор. В конкретних варіантах здійснення амінокислота являє собою пролін. В конкретних варіантах здійснення цукор являє собою маніт. В конкретних варіантах здійснення концентрація проліну становить від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення концентрація проліну становить приблизно 3 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення концентрація маніту становить приблизно 3 % (вага/об'єм).

У певних варіантах здійснення даного винаходу склад являє собою ліофілізований склад.

40 У певних варіантах здійснення даного винаходу склад проявляє високу стабільність відносно видимих частинок, не видимих неозброєним оком частинок, низькомолекулярних білків і високомолекулярних білків.

У варіанті здійснення даного винаходу передбачений стабільний ліофілізований склад на основі антитіла, що містить: приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3; приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ; приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80; приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та приблизно 3 % (вага/об'єм) проліну; де рН складу становить приблизно рН 7.

У варіанті здійснення даного винаходу передбачений стабільний ліофілізований склад на основі антитіла, що містить: приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3; приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ; приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80; приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та приблизно 3 % (вага/об'єм) маніту; де рН складу становить приблизно рН 7.



У варіанті здійснення даного винаходу передбачений набір, що включає ємність, яка містить склад за даним винаходом та інструкції із введення та застосування складу.

У варіанті здійснення даного винаходу передбачений спосіб лікування алергічного захворювання, раку, астми, захворювання, асоційованого з аномальним виробленням IL-4 та/або IL-13, або захворювання, асоційованого з посиленою відповіддю, опосередкованою TH-2, який включає введення складу за даним винаходом суб'єкту, який цього потребує.

Короткий опис графічних матеріалів

Фігура 1 являє собою схематичне зображення, на якому показана ілюстративна молекула біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, що містить два легких ланцюги та два важких ланцюги. Два легких ланцюги містять компонент N-VL<sub>hB-B13</sub>-лінкер-VL<sub>h8D4-8</sub>-CL-C, а два важких ланцюги містять компонент N-VH<sub>hB-B13</sub>-лінкер-VH<sub>h8D4-8</sub>-CH1-CH2-CH3-C. Послідовність лінкера містить (G4S)<sub>2</sub> або GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

На фігурі 2 зображені амінокислотні послідовності ілюстративного антитіла, тобто гуманізовані варіабельні домени антитіла B-B13 до IL-13 (SEQ ID NO: 1 та 2) і гуманізовані варіабельні домени антитіла 8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 3, 4 та 5). Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані послідовності CDR (SEQ ID NO: 7-21).

Фігура 3 являє собою групу зображень, на яких показано забруднення частинками в аналізі № P5 (підбирання pH буфера) після впливу струшування.

Фігура 4 являє собою графік, на якому показано забруднення не видимими неозброєним оком частинками > 1,5 мкм після декількох видів впливу в аналізі № P6 (підбирання pH буфера).

Фігура 5 являє собою графік, на якому показано забруднення не видимими неозброєним оком частинками > 10 мкм після декількох видів впливу в аналізі № P6 (підбирання pH буфера).

Фігура 6 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P6 (підбирання pH буфера) після термічного впливу.

Фігура 7 являє собою графік, на якому показані SEC-хроматограми в аналізі № P5 (підбирання pH буфера) через 2 тижні при 45 °C.

Фігура 8 являє собою зображення гелю для SDS-PAGE в аналізі № P5 (підбирання pH буфера) через 2 тижні при 45 °C.

Фігура 9 являє собою зображення гелю для IEF через 2 тижні при 45 °C в аналізах № P5 і № 6 (підбирання pH буфера).

Фігура 10 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW після завершення програми впливу в аналізі № P13 (ефект солей).

На фігурі 11 показані зображення світлин, отриманих за допомогою бінокулярного мікроскопа в аналізі № P12 (поверхнево-активна речовина) після механічного впливу.

Фігура 12 являє собою графік, на якому показано відстеження рівня HMW в аналізі № P12 (поверхнево-активна речовина) при зберіганні протягом 6 тижнів при 5 °C.

Фігура 13 являє собою графік, на якому показано відстеження рівня HMW в аналізі № P12 (добавка) при зберіганні протягом 6 тижнів при 5 °C.

Фігура 14 являє собою графік, на якому показано відстеження рівня HMW в аналізі № P20-FDS (добавка) при зберіганні протягом 4 тижнів при 5 °C.

Фігура 15 являє собою графік, на якому показано відстеження рівня HMW в аналізі № P21 (добавка) при зберіганні протягом 2 тижнів при 5 °C.

Фігура 16 являє собою графік залежності зворотного показника змісту мономерів від часу при порівнянні 1 % проліну з 3 % проліном у лідерному складі.

Фігура 17 являє собою графік послідовних змін температури протягом способу сублімаційного сушіння складу № P16-1.

На фігурі 18 показані зображення осаду № P18-1 у флаконі з пресованого скла на 15 мл.

Фігура 19 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P14 (добавка) після завершення способу ліофілізації.

Фігура 20 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P20 (добавка) після ліофілізації.

Фігура 21 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW (а) і зображення (б) після завершення циклу заморожування-розморожування для нескладеного DS (аналіз № 9).

Фігура 22 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P14 (добавка) після розведення.

Фігура 23 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P20 (добавка) після розведення.

Фігура 24 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P17 (добавка) після зберігання та розведення осаду.

Фігура 25 являє собою графік, на якому показаний рівень HMW в аналізі № P20 (добавка) після зберігання та розведення осаду.

Фігура 26 являє собою графік, на якому показані результати DSC для першого підбирання (аналізи №№ H04-150-172 – підбирання pH буфера).

5 На фігурі 27 показані зображення візуального аспекту складів з гістидином та сукцинатом (аналізи №№ P-H04-144 та № 148, №№ H04-150 A1-A6).

Фігура 28 являє собою графіки, на яких показана динаміка рівня HMW для підбирання буфера при 5 °C (аналізи №№ H04-150 B1) і RT (аналізи №№ H04-163 A1, B1, B2 і H04-172 A1, A2), визначена за допомогою SEC.

10 Фігура 29 являє собою графік, на якому показані результати DSC для підбирання pH фосфатного/Tris-буфера (аналізи №№ H04-187).

Фігура 30 являє собою графік, на якому показана динаміка рівня HMW для підбирання pH фосфатного/Tris-буфера, визначена за допомогою SEC (аналізи №№ H04-187).

15 Фігура 31 являє собою графік, на якому показані результати DSC для підбирання концентрації буфера (аналізи №№ H04-185).

Фігура 32 являє собою графіки, на яких показана динаміка рівня HMW залежно від концентрації буфера при RT, визначена за допомогою SEC (аналізи №№ H04-185).

Фігура 33 являє собою графік, на якому показана динаміка рівня HMW для NaCl при RT, визначена за допомогою SEC (аналізи №№ H04-185).

20 Фігура 34 являє собою таблицю, у якій показана динаміка рівня HMW для гліцину в порівнянні з цукрозою при RT, визначена за допомогою SEC (аналізи №№ H04-185).

#### Докладний опис

Даний винахід не обмежений конкретними методиками, протоколами, лініями клітин, векторами або реагентами, описаними в даному документі, оскільки вони можуть варіювати без відступу від суті та обсягу даного винаходу. Крім того, термінологія, використана в даному документі, служить тільки для пояснення на прикладі конкретних варіантів здійснення та не призначена для обмеження обсягу даного винаходу. Будь-який спосіб і матеріал, подібний до описаних в даному документі або еквівалентний їм, можна застосовувати при практичному здійсненні даного винаходу, і в даному документі описані тільки ілюстративні способи, обладнання та матеріали.

Усі патенти та публікації, згадані в даному документі, включені в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання з метою опису та розкриття білків, ферментів, векторів, клітин-хазяїв і методик, що описують в ньому, які можна застосовувати разом з даним винаходом та в його рамках. Однак, ніщо в даному документі не слід тлумачити як визнання того, що даний винахід не має підстав для протиставлення такому розкриттю як більш ранній винахід.

#### A. Визначення

Якщо не визначене інше, усі технічні та наукові терміни, використовувані в даному документі, мають таке ж значення, яке зазвичай розуміється фахівцем у даній галузі.

40 В даному документі зазначено, що застосовані в даному описі та доданій формулі винаходу форми однини також включають посилання на множину, якщо в контексті прямо не зазначено інше.

Термін "майже" або "приблизно" означає в межах 10 % і більш переважно в межах 5 % (або 1 %, або менше) від зазначеного значення або діапазону.

45 Терміни "вводити" або "введення" відносяться до акту ін'єкції або іншої фізичної доставки речовини, що перебуває поза організмом (наприклад, складу за даним винаходом), пацієнтові, як, наприклад, за допомогою черезслизової, внутрішньошкірної, внутрішньовенної, підшкірної, внутрішньом'язової доставки та/або будь-якого іншого способу фізичної доставки, описаного в даному документі або відомого з рівня техніки. Якщо здійснюють лікування захворювання або його симптому, то введення речовини, як правило, відбувається після початку прояву захворювання або його симптомів. Якщо здійснюють попередження захворювання або його симптомів, то введення речовини, як правило, відбувається до початку прояву захворювання або його симптомів.

50 Стосовно поліпептиду термін "аналог" відноситься до поліпептиду, що має функцію, подібну або ідентичну такій у біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмента біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічного епітоп-зв'язуючого фрагмента для IL-4/IL-13 або біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, але що не обов'язково містить амінокислотну послідовність, подібну або ідентичну такій у біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмента біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічного епітоп-зв'язуючого фрагмента для IL-4/IL-13 або біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, або, що має структуру, подібну або ідентичну такій у біспецифічного поліпептиду, що

зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмента біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічного епітоп-зв'язуючого фрагмента для IL-4/IL-13 або біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13. Поліпептид, що має подібну амінокислотну послідовність, означає поліпептид, що задовольняє щонайменше одному з наступного: (а) поліпептид, що має амінокислотну послідовність, щонайменше на 30 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 % і переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 95 % або найбільш переважно щонайменше на 99 % ідентичну амінокислотній послідовності біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13 (наприклад, SEQ ID NO: 1-5), фрагмент біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічний епітоп-зв'язуючий фрагмент для IL-4/IL-13 або біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13, описані у даному документі; (b) поліпептид, що кодується нуклеотидною послідовністю, яка гібридизується в жорстких умовах з нуклеотидною послідовністю, що кодує біспецифічний поліпептид, що зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмент біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічний епітоп-зв'язуючий фрагмент для IL-4/IL-13 або біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 (або його VH-, або VL-область), описані в даному документі, що мають щонайменше 5 амінокислотних залишків, щонайменше 10 амінокислотних залишків, щонайменше 15 амінокислотних залишків, щонайменше 20 амінокислотних залишків, щонайменше 25 амінокислотних залишків, щонайменше 40 амінокислотних залишків, щонайменше 50 амінокислотних залишків, щонайменше 60 амінокислотних залишків, щонайменше 70 амінокислотних залишків, щонайменше 80 амінокислотних залишків, щонайменше 90 амінокислотних залишків, щонайменше 100 амінокислотних залишків, щонайменше 125 амінокислотних залишків або щонайменше 150 амінокислотних залишків (див., наприклад, Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); і (c) поліпептид, що кодується нуклеотидною послідовністю, щонайменше на 30 %, щонайменше на 35 %, щонайменше на 40 %, щонайменше на 45 %, щонайменше на 50 %, щонайменше на 55 %, щонайменше на 60 %, щонайменше на 65 %, щонайменше на 70 %, щонайменше на 75 %, щонайменше на 80 %, щонайменше на 85 % і переважно щонайменше на 90 %, більш переважно щонайменше на 95 % або найбільш переважно щонайменше на 99 % ідентичною нуклеотидній послідовності, що кодує біспецифічний поліпептид, що зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмент біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічний епітоп-зв'язуючий фрагмент для IL-4/IL-13 або біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 (або його VH-, або VL-область), описані в даному документі. Поліпептид зі структурою, подібною такій у біспецифічного поліпептидного антитіла до IL-4/IL-13, фрагмента біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічного епітоп-зв'язуючого фрагмента для IL-4/IL-13 або біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, означає поліпептид, що має вторинну, третинну або четвертинну структуру, подібну такій у біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, фрагмента біспецифічного поліпептиду, що зв'язується з IL-4/IL-13, біспецифічного епітоп-зв'язуючого фрагмента для IL-4/IL-13 або біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13. Структуру поліпептиду можна визначити за допомогою способів, відомих фахівцям у даній галузі, що включають, без обмеження, рентгенівську кристалографію, ядерний магнітний резонанс і кристалографічну електронну мікроскопію.

Для визначення відсоткової ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнової кислоти послідовності вирівнюють з метою оптимального порівняння (наприклад, у першу амінокислотну послідовність або послідовність нуклеїнової кислоти можна вводити гепи для оптимального вирівнювання з другою амінокислотною послідовністю або послідовністю нуклеїнової кислоти). Амінокислотні залишки або нуклеотиди у відповідних положеннях амінокислот або положеннях нуклеотидів потім порівнюють. Якщо положення в першій послідовності зайняте тим же амінокислотним залишком або нуклеотидом, що й відповідне положення в другій послідовності, то молекули є ідентичними за цим положенням. Відсоткова ідентичність двох послідовностей залежить від кількості ідентичних положень, загальних для послідовностей (тобто % ідентичності = кількість ідентичних положень, що перекриваються/загальна кількість положень  $\times 100$  %). В одному варіанті здійснення дві послідовності мають однакову довжину.

Визначення відсоткової ідентичності двох послідовностей (наприклад, амінокислотних послідовностей або послідовностей нуклеїнової кислоти) також можна здійснювати за допомогою математичного алгоритму. Переважним необмежуваним прикладом математичного алгоритму, використовуваного для порівняння двох послідовностей, є алгоритм Karlin and

Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, у модифікації за Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Цей алгоритм включений до складу програм NBLAST та XBLAST, описаних в Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Пошук нуклеотидних послідовностей в BLAST можна проводити за допомогою програми пошуку нуклеотидних послідовностей NBLAST з параметрами, встановленими, наприклад, для ваги = 100, довжини слова = 12, для отримання нуклеотидних послідовностей, гомологічних молекулам нуклеїнових кислот, що представляють інтерес. Пошук амінокислотних послідовностей в BLAST можна проводити за допомогою програми XBLAST з параметрами, встановленими, наприклад, для ваги = 50, довжини слова = 3, для отримання амінокислотних послідовностей, гомологічних молекулі білка, що представляє інтерес. Для отримання вирівнювань з гепами для цілей порівняння можна використовувати BLAST з гепами, описаний в Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Альтернативно, можна застосовувати PSI-BLAST для виконання ітеративного пошуку, що виявляє віддалене споріднення між молекулами (Id.). При використанні програм BLAST, BLAST з гепами та PSI-BLAST можна застосовувати параметри за промовчанням відповідних програм (наприклад, XBLAST і NBLAST) (див., наприклад, Національний центр біотехнологічної інформації (NCBI) в Інтернеті за адресою [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Іншим переважним необмежуваним прикладом математичного алгоритму, використовуваного для порівняння послідовностей, є алгоритм Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17 Цей алгоритм включений до складу програми ALIGN (версії 2.0), яка є частиною пакета програмного забезпечення GCG для вирівнювання послідовностей. При використанні програми ALIGN для порівняння амінокислотних послідовностей можна застосовувати таблицю ваг заміни залишків PAM120, штраф за продовження гепу 12 і штраф за відкриття гепу 4.

Відсоткову ідентичність двох послідовностей можна визначити за допомогою методик, подібних описаним вище, допускаючи або не допускаючи гепи. При розрахунках відсоткової ідентичності зазвичай підраховують тільки точні збіги.

"Антагоніст" або "інгібітор" відноситься до молекули, здатної до інгібування одного або декількох видів біологічної активності цільової молекули, такого як передача сигналу за допомогою IL-4 та/або IL-13. Антагоністи можуть перешкоджати зв'язуванню рецептора з лігандом і навпаки шляхом обмеження здатностей або знищення клітин, що активуються лігандом, та/або шляхом перешкоджання активації рецептора або ліганду (наприклад, активації тирозинкінази) або передачі сигналу після зв'язування ліганду з рецептором. Антагоніст може повністю блокувати взаємодії рецептора та ліганду або може значно послабляти такі взаємодії. У певних варіантах здійснення даного винаходу біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 є гуманізованими антагоністичними біспецифічними антитілами до IL-4/IL-13, переважно гуманізованими моноклональними антагоністичними біспецифічними антитілами до IL-4/IL-13.

Терміни "антитіло", "імуноглобулін" або "Ig" можуть застосовуватися в даному документі на рівних підставах. Термін "антитіло" включає, без обмеження, синтетичні антитіла, моноклональні антитіла, антитіла, отримані рекомбінантним шляхом, поліспецифічні антитіла (у тому числі біспецифічні антитіла), людські антитіла, гуманізовані антитіла, химерні антитіла, внутрішньоклітинні антитіла, одноланцюгові Fv (scFv) (у тому числі, наприклад, моноспецифічні, біспецифічні тощо), камелізовані антитіла, Fab-фрагменти, F(ab')-фрагменти, Fv з дисульфідними зв'язками (sdFv), антиідіотипічні (анті-Id) антитіла та епітоп-зв'язуючі фрагменти будь-яких з вищевказаних об'єктів. Зокрема, антитіла включають молекули імуноглобулінів та імунологічно активні частини молекул імуноглобулінів, тобто антиген-зв'язуючі домени або молекули, що містять антиген-зв'язуючу ділянку, що специфічно зв'язується з антигеном IL-4 або IL-13 (наприклад, одну або кілька областей, що визначають комплементарність (CDR), біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13). Біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 можуть належати до будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA та IgY), можуть належати до будь-якого класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2) або будь-якому підкласу (наприклад, IgG2a та IgG2b) молекул імуноглобулінів. У переважних варіантах здійснення біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 є гуманізованими, такими як гуманізовані моноклональні біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13. У певних варіантах здійснення біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 являють собою антитіла IgG, людські антитіла IgG4.

Термін "антиген" відноситься до молекули або частини молекули, здатної до зв'язування антитілами за даним винаходом. Антиген може мати один або більше одного епітопа. Приклади антигенів, що розпізнаються антитілами за даним винаходом, включають, без обмеження, сироваткові білки, наприклад, цитокіни, такі як IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13, біологічно активні пептиди, молекули клітинної поверхні, наприклад, рецептори, переносники, іонні канали, вірусні та бактеріальні білки.

Термін "антиген-зв'язуюча ділянка" відноситься до частини антитіла, що містить область,

що специфічно зв'язується з частиною антигену або всім антигеном та комплементарну їм. Якщо антиген є великим, антитіло може зв'язуватися тільки з певною частиною антигену, яка називається епітопом. Антиген-зв'язуючий домен може бути представлений у вигляді одного або декількох варіабельних доменів антитіла. Антиген-зв'язуючий домен переважно утворений з'єднанням варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL) і варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH).

Термін "зв'язуючий засіб" відноситься до будь-якої молекули, такої як антитіло, siRNA, нуклеїнова кислота, аптамер, білок або низькомолекулярна органічна сполука, що зв'язується або специфічно зв'язується з IL-4 та/або IL-13 або їх варіантом або фрагментом.

Терміни "біспецифічне антитіло" або "біспецифічні антитіла (BsAb)" відносяться до молекул, у яких антиген-зв'язуючі ділянки двох антитіл об'єднані в одній молекулі. Таким чином, біспецифічне антитіло здатне зв'язуватися з двома різними антигенами одночасно. Крім шляхів застосування з метою діагностики, BsAb створюють передумови для нових шляхів застосування в терапії за допомогою перенаправлення сильних ефektorних систем на уражені ділянки або за допомогою посилення нейтралізуючих або стимулюючих видів активності антитіл. Біспецифічні антитіла можуть бути моноклональними, але переважно є людськими або гуманізованими. Способи отримання біспецифічних антитіл добре відомі в даній галузі техніки.

Термін "побічний продукт" включає небажані продукти, які зменшують або знижують відносний зміст терапевтичного/профілактичного зв'язуючого засобу, такого як антитіло, у зазначеному складі. Наприклад, типові побічні продукти включають агрегати антитіла, фрагменти антитіла, наприклад, отримані внаслідок розпаду антитіл шляхом дезамідування або гідролізу, або їх суміші. Як правило, агрегати являють собою комплекси, що мають молекулярну масу, більшу, ніж у мономерного антитіла. Продукти розпаду антитіл можуть включати, наприклад, фрагменти антитіла, наприклад, отримані в результаті дезамідування або гідролізу. Як правило, продукти розпаду являють собою комплекси, що мають молекулярну масу, меншу, ніж у мономерного антитіла. У випадку антитіла IgG такі продукти розпаду мають розмір менше, ніж приблизно 150 кДа.

Терміни "композиція" та "склад" призначені для охоплення продукту, що містить конкретні інгредієнти (наприклад, біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13), необов'язково в певних кількостях, а також будь-якого продукту, що прямо або побічно утворюється в результаті об'єднання певних інгредієнтів, необов'язково в певних кількостях.

Терміни "константна область" або "константний домен" відносяться до карбокси-кінцевої частини легкого та важкого ланцюгів, безпосередньо не залученої до зв'язування антитіла з антигеном, але, що проявляє різні ефektorні функції, такі як взаємодія з Fc-рецептором. Терміни відносяться до частини молекули імуноглобуліну, що має більш консервативну амінокислотну послідовність у порівнянні з іншою частиною імуноглобуліну, варіабельним доменом, яка містить антиген-зв'язуючу ділянку. Константний домен містить домени CH1, CH2 і CH3 важкого ланцюга і домен CHL легкого ланцюга.

Термін "порушення" відноситься до будь-якого стану, лікування якого за допомогою складу за даним винаходом буде мати користь. Він включає хронічні та гострі порушення або захворювання, у тому числі ті патологічні стани, які провокують розвиток в ссавців, і зокрема, у людей, порушення, яке розглядається. Необмежуючі приклади порушень, що підлягають лікуванню в даному документі, включають форми раку, запалення, аутоімунні захворювання, інфекції, серцево-судинні захворювання, захворювання органів дихання, неврологічні захворювання та метаболічні захворювання.

Термін "епітоп" відноситься до обмеженої області на поверхні антигену, такого як поліпептид IL-4 або IL-13 або фрагмент поліпептиду IL-4 або IL-13, здатної до зв'язування з однією або декількома антиген-зв'язуючими областями зв'язуючого засобу, такого як антитіло, та що має антигенну або імуногенну активність у тварини, переважно в ссавця та найбільш переважно в людини, яка здатна викликати імунну відповідь. Епітоп, що має імуногенну активність, являє собою частину поліпептиду, що викликає утворення антитіл у тварини. Епітоп, що має антигенну активність, являє собою частину поліпептиду, з якою специфічно зв'язується антитіло, що визначається за допомогою будь-якого способу, добре відомого в даній галузі техніки, наприклад, такого, як імунологічний аналіз. Епітопи антигену не обов'язково повинні бути імуногенними. Епітоп зазвичай складається з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти та/або цукрові бокові ланцюги, і мають конкретні характеристики тривимірної структури, а також конкретні характеристики заряду. Область поліпептиду, що бере участь в утворенні епітопу, може являти собою суміжні амінокислоти поліпептиду, або епітоп може бути утворений двома або більшою кількістю несуміжних областей поліпептиду. Епітоп може представляти або не представляти собою тривимірну характерну поверхневу ознаку

антигену. У певних варіантах здійснення епітоп IL-4 або IL-13 являє собою тривимірну характерну поверхневу ознаку поліпептиду IL-4 або IL-13. В інших варіантах здійснення епітоп IL-4 або IL-13 являє собою лінійну характерну ознаку поліпептиду IL-4 або IL-13. Біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 можуть специфічно зв'язуватися з епітопом денатурованої форми IL-4 або IL-13, епітопом нативної форми IL-4 або IL-13 або як з денатурованою формою, так і з нативної формою IL-4 або IL-13.

Термін "наповнювачі" відноситься до інертних речовин, що зазвичай застосовують як розріджувач, носій, консервант, зв'язуючу речовину, стабілізатор і т. п. для лікарських засобів, і включає, без обмежень, білки (наприклад, сироватковий альбумін і т. п.), амінокислоти (наприклад, аспарагінову кислоту, глутамінову кислоту, лізин, аргінін, гліцин, гістидин і т. п.), жирні кислоти та фосфоліпіди (наприклад, алкілсульфонати, каприлат і т. п.), поверхнево-активні речовини (наприклад, SDS, полісорбат, неіоногенну поверхнево-активну речовину і т. п.), сахариди (наприклад, цукрозу, мальтозу, трегалозу і т. п.) та поліоли (наприклад, маніт, сорбіт і т. п.). Див. також Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa., який включений у даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

Стосовно пептиду або поліпептиду термін "фрагмент" відноситься до пептиду або поліпептиду, що містить амінокислотну послідовність менше ніж повної довжини. Такий фрагмент може, наприклад, бути отриманий у результаті амінокінцевого усікання, карбоксикінцевого усікання та/або внутрішньої делеції залишку(залишків) в амінокислотній послідовності. Утворення фрагментів може, наприклад, бути обумовлене альтернативним сплайсингом РНК або протеазною активністю *in vivo*. У певних варіантах здійснення фрагменти hIL-4 або hIL-13 включають в себе поліпептиди, що містять амінокислотну послідовність зі щонайменше 5 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 10 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 15 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 20 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 25 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 40 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 50 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 60 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 70 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 80 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 90 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 100 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 125 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 150 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 175 суміжних амінокислотних залишків, щонайменше 200 суміжних амінокислотних залишків або щонайменше 250 суміжних амінокислотних залишків амінокислотної послідовності поліпептиду IL-4 або IL-13 або антитіла, що специфічно зв'язується з поліпептидом IL-4 або IL-13.

Фрази та терміни "функціональний фрагмент, варіант, похідне або аналог" і т. п., а також їх форми, стосовно антитіла або антигену означають сполуку або молекулу, що мають якісну біологічну активність нарівні з антитілом або антигеном повної довжини, що представляють інтерес. Наприклад, функціональний фрагмент або аналог антитіла до IL-4 може зв'язуватися з молекулою IL-4 або може перешкоджати здатності ліганду або агоністичного або антагоністичного антитіла до зв'язування з IL-4 або значно послабляти таку.

Термін "важкий ланцюг", який застосовують відносно антитіла, відноситься до п'яти різних типів, що називають альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\Delta$ ), епсілон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) та мію ( $\mu$ ), які виділяють на підставі амінокислотної послідовності константного домену важкого ланцюга. Ці різні типи важких ланцюгів добре відомі в даній галузі техніки та служать підставою для виділення п'яти класів антитіл, IgA, IgD, IgE, IgG та IgM, відповідно, що включають чотири підкласи IgG, а саме IgG1, IgG1, IgG3 та IgG4. Важкий ланцюг переважно являє собою людський важкий ланцюг.

Термін "шарнір" або "шарнірна ділянка" відносяться до гнучкого поліпептиду, що містить амінокислоти між першим і другим константними доменами антитіла.

"Гуманізовані" форми відмінних від людських (наприклад, мишачих) антитіл являють собою химерні імуноглобуліни, ланцюги імуноглобулінів або їх фрагменти (такі як  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  або інші зв'язуючі ціль підпослідовності антитіл), які містять послідовності, отримані з імуноглобуліну, відмінного від людського, у порівнянні з людським антитілом. Як правило, гуманізоване антитіло буде містити один, а найчастіше два варіабельні домена, практично в усіх з яких всі або практично всі CDR-області відповідають таким в імуноглобуліні, відмінному від людського, а всі або практично всі FR-області отримані з матричної послідовності людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло також може містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну ( $F_c$ ), зазвичай з обраної матриці на основі людського імуноглобуліну. Як правило, метою є отримання молекули антитіла, що має мінімальну імуногенність в організмі людини. Таким чином, одну або кілька амінокислот в одній або декількох CDR також можна замінити на менш імуногенні для людини-хазяїна без істотної мінімізації функції специфічного

зв'язування однієї або декількох CDR з IL-4 та/або IL-13. Альтернативно, FR може бути відмінною від людської, але найбільш імуногенні амінокислоти заміщують менш імуногенні. Проте, пересадження CDR, обговорюване вище, не є єдиним способом отримання гуманізованого антитіла. Наприклад, модифікація тільки CDR-областей може бути недостатньою, оскільки у визначенні тривимірної структури CDR-петель і загальної афінності антитіла до свого ліганду нерідко відіграють роль залишки каркасної області. Отже, на практиці можна застосовувати будь-які засоби, щоб модифікувати вихідну молекулу антитіла, відмінного від людського, роблячи її менш імуногенною для людини, і глобальна ідентичність послідовностей з людським антитілом не завжди є необхідною. Таким чином, гуманізацію також можна здійснювати, наприклад, лише шляхом заміни лише декількох залишків, зокрема тих, що знаходяться на поверхні молекули антитіла, і не занурених усередину молекули, і, отже, що не є легкодоступними для імунної системи хазяїна. Див., наприклад, Studnicka et al., Prot Eng 7(6):805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), WO 2006/042333 і патент США № 5869619. Альтернативно, антитіла можна гуманізувати за допомогою інших методик, у тому числі пересадженням CDR (EPO 0 239 400; WO 91/09967 і патенти США №№ 5530101 і 5585089), веніруванням або зміни поверхні (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; і Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) і перетасуванням ланцюгів (патент США № 5565332). Людські антитіла можна одержувати за допомогою ряду способів, відомих у даній галузі техніки, що включають, без обмеження, способи фагового дисплею, див. патенти США №№ 4444887, 4716111, 5545806 і 5814318; а також WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741, з використанням трансгенних тварин, таких як гризуни, з використанням химерних клітин тощо.

"Інтерлейкін-4" (IL-4) відноситься до білків IL-4 ссавців, що зустрічаються в природі, або ендогенних білків IL-4 ссавців і до білків, що мають таку ж амінокислотну послідовність, як і відповідні білки IL-4 ссавців, що зустрічаються в природі, або ендогенні білки IL-4 ссавців (наприклад, рекомбінантних білків, синтетичних білків (тобто які отримують за допомогою способів синтетичної органічної хімії)). Відповідно, визначений у даному документі термін включає зрілий білок IL-4, поліморфні або алельні варіанти та інші ізоформи IL-4, а також модифіковані або немодифіковані форми вищезгаданих об'єктів (наприклад, ліпідизовані, глікозильовані). IL-4, що зустрічається в природі, або ендогенний IL-4 включає в себе білки дикого типу, такі як зрілий IL-4, поліморфні або алельні варіанти та інші ізоформи і мутантні форми, що зустрічаються в природі у ссавців (наприклад, у людей, у відмінних від людини приматів). Такі білки можна, наприклад, добувати або виділяти з джерела, що у природних умовах виробляє IL-4. Ці білки та білки, що мають таку ж амінокислотну послідовність, як і відповідні IL-4, що зустрічаються в природі, або ендогенні IL-4, називають за назвою відповідного ссавця. Наприклад, якщо відповідним ссавцем є людина, то білок позначають як людський IL-4. У даній галузі техніки відомо кілька мутантних білків IL-4, таких як розкриті в WO 03/038041.

"Інтерлейкін-13" (IL-13) відноситься до білків IL-13 ссавців, що зустрічаються в природі, або ендогенних білків IL-13 ссавців і до білків, що мають таку ж амінокислотну послідовність, як і відповідні білки IL-13 ссавців, що зустрічаються в природі, або ендогенні білки IL-13 ссавців (наприклад, рекомбінантних білків, синтетичних білків (тобто які отримують за допомогою способів синтетичної органічної хімії)). Відповідно, визначений у даному документі термін включає зрілий білок IL-13, поліморфні або алельні варіанти та інші ізоформи IL-13 (наприклад, отримані за допомогою альтернативного сплайсингу або інших клітинних процесів), а також модифіковані або немодифіковані форми вищезгаданих об'єктів (наприклад, ліпідизовані, глікозильовані). IL-13, що зустрічаються в природі, або ендогенні IL-13 включають в себе білки дикого типу, такі як зрілий IL-13, поліморфні або алельні варіанти та інші ізоформи та мутантні форми, що зустрічаються в природі в ссавців (наприклад, у людей, у відмінних від людини приматів). Наприклад, як використовується в даному документі, IL-13 охоплює варіант людського IL-13, асоційований з астмою (атопічною та неатопічною астмою), у якому Arg у положенні 110 зрілого людського IL-13 заміщений Gin (положення 110 зрілого IL-13 відповідає положенню 130 білка-попередника), та інші варіанти IL-13 (Heinzmann et al, Hum Mol Genet. 9:549-559 (2000)). Такі білки можна, наприклад, добувати або виділяти з джерела, що у природних умовах виробляє IL-13. Ці білки та білки, що мають таку ж амінокислотну послідовність, як і відповідні IL-13, що зустрічаються в природі, або ендогенні IL-13, називають за назвою відповідного ссавця. Наприклад, якщо відповідним ссавцем є людина, то білок позначають як людський IL-13. У даній галузі техніки відомо кілька мутантних білків IL-13, таких

як розкриті в WO 03/035847.

"Виділений" або "очищений" зв'язуючий засіб, такий як антитіло, практично не містить клітинний матеріал або інших забруднюючих білків з клітинного або тканинного джерела, з якого отриманий зв'язуючий засіб, або практично не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин у випадку отримання шляхом хімічного синтезу. Наприклад, висловлення "практично не містить клітинний матеріал" включає препарати антитіл, у яких антитіло відділене від клітинних компонентів клітин, з яких воно виділене або отримане рекомбінантним шляхом. Таким чином, антитіло, що практично не містить клітинний матеріал, включає препарати антитіла, що мають менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 % або 5 % (за сухою вагою) гетерологічного білка (що також називається в даному документі "забруднюючим білком"). Якщо антитіло отримано рекомбінантним шляхом, то воно також переважно практично не містить культуральне середовище, тобто культуральне середовище представляє менш ніж приблизно 20 %, 10 % або 5 % від об'єму білкового препарату. Якщо антитіло отримане шляхом хімічного синтезу, то воно переважно практично не містить хімічних попередників або інших хімічних речовин, тобто воно відділене від хімічних попередників або інших хімічних речовин, що брали участь у синтезі білка. Відповідно, такі препарати антитіла мають менш ніж приблизно 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (за сухою вагою) хімічних попередників або сполук, відмінних від антитіла, що представляє інтерес. У переважному варіанті здійснення біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 є виділеними або очищеними.

Термін "нумерація за Кабат" і подібні терміни прийняті в даній галузі техніки та відносяться до системи нумерації амінокислотних залишків, що є більш варіабельними (тобто гіперваріабельними), ніж інші амінокислотні залишки у варіабельних областях важкого та легкого ланцюгів антитіла або його антиген-зв'язуючої частини (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 і Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публікація NIH № 91-3242). У випадку варіабельної області важкого ланцюга гіперваріабельна область зазвичай знаходиться в межах положень амінокислот 31-35 для CDR1, положень амінокислот 50-65 для CDR2 і положень амінокислот 95-102 для CDR3. У випадку варіабельної області легкого ланцюга гіперваріабельна область зазвичай знаходиться в межах положень амінокислот 24-34 для CDR1, положень амінокислот 50-56 для CDR2 і положень амінокислот 89-97 для CDR3.

Термін "легкий ланцюг", який застосовують відносно антитіла, відноситься до двох різних типів, що називають каппа ( $\kappa$ ) або лямбда ( $\lambda$ ), які виділяють на підставі амінокислотної послідовності константних доменів. Амінокислотні послідовності легкого ланцюга добре відомі в даній галузі техніки. У переважних варіантах здійснення легкий ланцюг являє собою людський легкий ланцюг.

Термін "лінкер" відноситься до молекули, що з'єднує антиген-зв'язуючі домени антитіла. Лінкер може являти собою лінкерну молекулу будь-якого виду. Лінкер переважно являє собою поліпептид. Лінкери можуть бути однаковими або відрізнятися один від одного в межах поліпептидного важкого ланцюга та поліпептидного легкого ланцюга та між ними. Крім того, лінкер може мати довжину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот. Переважна пептидна лінкерна ланка для доменів важкого ланцюга, як і у випадку доменів легкого ланцюга, являє собою  $(G4S)_2$ , тобто GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Кількості лінкерних ланок у важкому ланцюзі та у легкому ланцюзі можуть бути однаковими (симетричний порядок) або відрізнятися один від одного (асиметричний порядок). Пептидний лінкер переважно є досить довгим для забезпечення належного ступеня гнучкості для запобігання перешкоджання антиген-зв'язуючими компонентами активності один одного, наприклад, у результаті стеричної невідповідності, для забезпечення правильного згортання білка та, при необхідності, для надання молекулам антитіла можливості взаємодії з двома або більше, можливо, розташованими на великій відстані один від одного, рецепторами на поверхні однієї й тієї ж клітини; ще він переважно є досить коротким для надання компонентам антитіла можливості збереження стабільності у клітині. Таким чином, фахівець у даній галузі може без зусиль вибрати довжину, композицію та/або конформацію пептидних лінкерів з метою оптимізації бажаних властивостей полівалентного антитіла.

Терміни "низький вміст солей" і "низька концентрація солей" означають відносно низьку концентрацію солей, яка складає 15 мМ або менше, у тому числі концентрацію солей 0 або відсутність солей. Концентрацію солей визначають за кількістю солей і буферів у складі. Переважно, щоб буферна система була присутня в складах у низькій концентрації, тобто приблизно 15 мМ або менше, з метою зниження іонної сили складів. Альтернативно, деякі переважні варіанти здійснення не містять солі та не містять буфери. Також переважно, щоб до складів не додавали додаткових солей, таких як NaCl, з метою підтримки як можна більш



низької іонної сили складів.

Терміни "контролювати", "контролюючий" і "контроль" відносяться до сприятливих ефектів, які суб'єкт отримує від засобу терапії (наприклад, профілактичного або терапевтичного засобу), який не приводить у результаті до лікування від інфекції. У певних варіантах здійснення суб'єкту вводять один або кілька засобів терапії (наприклад, профілактичних або терапевтичних засобів, таких як склад за даним винаходом) для "контролю" захворювання, опосередкованого IL-4 або IL-13 (наприклад, форм раку, запалення, аутоімунних захворювань, інфекцій, серцево-судинних захворювань, захворювань органів дихання, неврологічних захворювань та метаболічних захворювань), одного або декількох його симптомів, щоб попередити прогресування або погіршення перебігу захворювання.

Термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманому з популяції однорідних або практично однорідних антитіл, та кожне моноклональне антитіло, як правило, буде розпізнавати один епітоп на поверхні антигену. У переважних варіантах здійснення "моноклональне антитіло" являє собою антитіло, що продукується однією гібридомною або іншою клітиною. Термін "моноклональний" не обмежений яким-небудь конкретним способом отримання антитіла. Наприклад, моноклональні антитіла можна отримувати за допомогою гібридомного способу, описаного в Kohler et al.; Nature, 256:495 (1975), або можна виділяти з фагових бібліотек. Інші способи отримання клональних ліній клітин та моноклональних антитіл, що експресуються в них, добре відомі в даній області техніки (див., наприклад, Chapter 11 в Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.; Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York).

Термін "фармацевтична композиція", який застосовують у даному винаході, відноситься до складів різних препаратів. Склади, що містять терапевтично ефективні кількості антитіл, являють собою стерильні рідкі розчини, рідкі суспензії або ліофілізовані варіанти і необов'язково містять стабілізатори або наповнювачі.

Термін "фармацевтично прийнятний" означає схвалений регуляторним органом федерального уряду або уряду штату або описаний у Фармакопеї США, Європейській фармакопеї або іншій загальноновизнаній фармакопеї для застосування у тварин і, більш конкретно, у людей.

Під "фармацевтично прийнятним наповнювачем" розуміють будь-яку інертну речовину, що поєднується з активною молекулою, такою як моноклональне антитіло, для отримання прийнятної або зручної лікарської форми. "Фармацевтично прийнятний наповнювач" являє собою наповнювач, який є нетоксичним для пацієнтів, що його одержують у дозуваннях і концентраціях, що використовуються, і є сумісним з іншими інгредієнтами складу, що містить моноклональне антитіло.

Терміни "попереджати", "попереджувач" і "попередження" відносяться до повного або часткового пригнічення розвитку, рецидиву, прояву або поширення захворювання, опосередкованого IL-4 або IL-13, та/або симптому, пов'язаного з ним, у результаті введення засобу терапії або комбінації засобів терапії, передбачених у даному документі (наприклад, комбінації профілактичних або терапевтичних засобів, таких як склад за даним винаходом).

Термін "профілактичний засіб" відноситься до будь-якого засобу, який може повністю або частково пригнічувати розвиток, рецидив, прояв або поширення захворювання, опосередкованого IL-4 або IL-13, та/або симптому, пов'язаного з ним, у суб'єкта. У певних варіантах здійснення термін "профілактичний засіб" відноситься до складу за даним винаходом. У певних інших варіантах здійснення термін "профілактичний засіб" відноситься до засобу, відмінного від складу за даним винаходом. Профілактичний засіб переважно являє собою засіб, про який відомо, що він є застосовним, або застосовувався, або застосовується в цей час для попередження захворювання, опосередкованого IL-4 або IL-13, та/або симптому, пов'язаного з ним, або перешкоджання прояву, розвитку, прогресуванню та/або обтяженню захворювання, опосередкованого IL-4 або IL-13, та/або симптому, пов'язаного з ним. В конкретних варіантах здійснення профілактичний засіб являє собою гуманізоване біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13.

Фраза "рекомбінантне антитіло" включає антитіла, що отримуються, експресуються, створюються або виділяються рекомбінантним шляхом, такі як антитіла, що експресуються за допомогою рекомбінантного вектора експресії, трансфікованого в клітину-хазяїна, антитіла, що виділяються з комбінаторної бібліотеки рекомбінантних людських антитіл, антитіла, що виділяються з тварини (наприклад, миші або корови), яка є трансгенною та/або трансхромосомною за генами людських імуноглобулінів (див., наприклад, Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), або антитіла, що отримуються, експресуються, створюються або виділяються будь-яким іншим способом, що включає з'єднання послідовностей генів людських імуноглобулінів з іншими послідовностями ДНК. Такі

рекомбинантні антитіла можуть мати варіабельні та константні області, отримані з послідовностей імуноглобулінів (див. Kabat, E. A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публікація NIH № 91-3242). У певних варіантах здійснення, однак, такі рекомбінантні антитіла піддають мутагенезу *in vitro* (або, якщо застосовують тварину, трансгенну за послідовностями людського Ig, соматичному мутагенезу *in vivo*), і тому амінокислотні послідовності VH- і VL-областей рекомбінантних антитіл є послідовностями, які, будучи отриманими з послідовностей VH і VL зародкового типу та родинними їм, у природніх умовах можуть не існувати в наборі антитіл зародкового типу *in vivo*.

Термін "сахарид" відноситься до класу молекул, що є похідними багатоатомних спиртів. Сахариди звичайно називаються вуглеводами і можуть містити цукрові (сахаридні) ланки в різних кількостях, наприклад, у випадку моносахаридів, дисахаридів і полісахаридів.

Терміни "специфічно зв'язується" або "специфічне зв'язування" означають специфічне зв'язування з антигеном або його фрагментом і відсутність специфічного зв'язування з іншими антигенами. Наприклад, антитіло, що специфічно зв'язується з антигеном, може зв'язуватися з іншими пептидами або поліпептидами з більш низькою афінністю, яка визначається, наприклад, за допомогою радіоімунологічних аналізів (RIA), твердофазних імуоферментних аналізів (ELISA), аналізів на BIAcore або інших аналізів, відомих у даній області техніки. Антитіла або їх варіанти, або фрагменти, що специфічно зв'язуються з антигеном, можуть проявляти перехресну реактивність з родинними антигенами. Антитіла або їх варіанти, або фрагменти, що специфічно зв'язуються з антигеном, переважно не реагують перехресно з іншими антигенами. Антитіло або його варіант, або фрагмент, що специфічно зв'язується з антигеном IL-4 і/або IL-13, можна ідентифікувати, наприклад, за допомогою імунологічних аналізів, аналізів на BIAcore або інших методик, відомих фахівцям у даній області. Інтенсивність специфічної або вибіркової реакції в типовому випадку буде щонайменше у два рази перевищувати фоновий сигнал або шум і в більш типовому випадку більш ніж в 10 раз перевищувати фоновий рівень. Див., наприклад, Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology* Second Edition, Raven Press, New York, на сторінках 332-336 відносно обговорення специфічності антитіл.

"Стабільний" або "стабілізований" склад являє собою склад, у якому зв'язуючий засіб, такий як антитіло, що перебуває в ньому, по суті зберігає його фізичну стабільність, ідентичність, цілісність, і/або хімічну стабільність, ідентичність, цілісність, і/або біологічну активність при зберіганні. Різні аналітичні методики для виміру стабільності білків доступні в даній області техніки та розглядаються, наприклад, в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) і Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Стабільність можна вимірювати при певній температурі та інших умовах зберігання протягом певного періоду часу. Стабільність можна визначати за допомогою щонайменше одного зі способів, обраних із групи, що складається з візуального огляду, SDS-PAGE, IEF, HPSEC, RFFIT і ELISA каппа/лямбда-ланцюгів. Наприклад, антитіло "зберігає свою фізичну стабільність" у фармацевтичному складі, якщо воно не проявляє ознак агрегації, осадження та/або денатурації після візуального дослідження кольору та/або прозорості або згідно з вимірами за допомогою розсіювання UV-світла, SDS-PAGE або за допомогою ексклюзійної хроматографії (високого тиску) (HPSEC). При застосуванні складів за даним винаходом переважно 5 % або менше, звичайно 4 % або менше, переважно 3 % або менше, більш переважно 2 % або менше та, зокрема, 1 % або менше антитіл утворюють агрегати згідно з вимірами за допомогою HPSEC або будь-якого іншого підходящого способу виміру утворення агрегатів. Наприклад, антитіло вважається стабільним у конкретному складі, якщо мономерне антитіло має чистоту, яка складає приблизно 90 %, переважно приблизно 95 %, зокрема, приблизно 98 %, після певного заданого періоду часу за певних умов зберігання в конкретному складі. Хімічну стабільність можна оцінити шляхом виявлення та кількісного визначення хімічно змінених форм білка. Хімічна зміна може включати модифікацію розміру (наприклад, усікання), яку можна оцінити, наприклад, за допомогою (HP)SEC, SDS-PAGE і/або матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації/час-пролітної мас-спектрометрії (MALDI/TOF MS). Інші типи хімічної зміни включають зміну заряду (наприклад, що відбувається в результаті дезамідування), яку можна оцінити, наприклад, за допомогою іонообмінної хроматографії. Антитіло "зберігає свою біологічну активність" у фармацевтичному складі в певний момент часу, якщо біологічна активність антитіла в певний момент часу становить щонайменше приблизно 90 % (у межах помилок аналізу) від біологічної активності, що проявляється в момент отримання фармацевтичного складу, що визначається, наприклад, в аналізі зв'язування антигену або аналізі нейтралізації вірусу.

Терміни "суб'єкт" і "пацієнт" використовуються на рівних підставах. Як використовується в

даному документі, суб'єкт переважно є ссавцем, таким як ссавець, відмінний від примата (наприклад, корови, свині, коні, кішки, собаки, пацюки та т.п.), або примат (наприклад, мавпа та людина), більш переважно людина. В одному варіанті здійснення суб'єкт є ссавцем, переважно людиною, що має захворювання, опосередковане IL-4 і/або IL-13. В іншому варіанті здійснення суб'єкт є ссавцем, переважно людиною, що має ризик розвитку захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13.

Фраза "практично ідентичний" стосовно поліпептидної послідовності ланцюга антитіла може бути витлумачена як ланцюг антитіла, що володіє щонайменше 70 %, 80 %, 90 %, 95 % або більшою ідентичністю послідовності з еталонною поліпептидною послідовністю. Даний термін стосовно послідовності нуклеїнової кислоти може бути витлумачений як послідовність нуклеотидів, що володіє щонайменше приблизно 85 %, 90 %, 95 %, або 97 %, або більшою ідентичністю послідовності з еталонною послідовністю нуклеїнової кислоти.

У варіантів "з замінами" щонайменше один амінокислотний залишок в нативній послідовності вилучений і заміщений іншою амінокислотою, вставленою на його місце в те ж саме положення. Заміни можуть бути одиночними, при яких у молекулі замінена тільки одна амінокислота, або можуть бути багаторазовими, при яких в одній і тій же молекулі замінено дві або більше амінокислоти. Множинні заміни можуть мати місце в сайтах, розташованих один за одним. Також одна амінокислота може бути замінена безліччю залишків, і в цьому випадку такий варіант містить як заміну, так і вставку. У варіантів "з вставками" одна або кілька амінокислот вставлені безпосередньо прилягаючими до амінокислоти в конкретному положенні в нативній послідовності. Безпосередньо прилягаючий до амінокислоти означає з'єднаний з функціональною  $\alpha$ -карбоксильною або  $\alpha$ -аміногрупою амінокислоти. У варіантів "з делеціями" одна або кілька амінокислот в нативній амінокислотній послідовності вилучені. Зазвичай у варіантів з делеціями вилучено одна або дві амінокислоти в конкретній області молекули.

Термін "терапевтично ефективна кількість" відноситься до кількості засобу терапії (наприклад, складу за даним винаходом), достатнього для зниження та/або зменшення важкості та/або тривалості зазначеного захворювання та/або симптому, пов'язаного з ним. Даний термін також охоплює кількість, необхідну для ослаблення або зменшення інтенсивності ходу або прогресування зазначеного захворювання, ослаблення або зменшення інтенсивності рецидиву, розвитку або прояву зазначеного захворювання та/або для поліпшення або посилення профілактичного(профілактичних) або терапевтичного(терапевтичних) ефекту(ефектів) іншого засобу терапії (наприклад, засобу терапії, відмінного від складу за даним винаходом). У деяких варіантах здійснення терапевтично ефективна кількість антитіла за даним винаходом забезпечує місцеву концентрацію, яка складає приблизно 5-20 нг/мл і переважно приблизно 10-20 нг/мл. У деяких варіантах здійснення "терапевтично ефективна кількість", яку використовують в даному документі, також відноситься до кількості антитіла за даним винаходом для досягнення певного результату (наприклад, інгібування цитокіну IL-4 і/або IL-13).

Термін "терапевтичний засіб" відноситься до будь-якого засобу, який можна застосовувати в лікуванні, контролі або зменшенні інтенсивності захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13, і/або симптому, пов'язаного з ним. У певних варіантах здійснення термін "терапевтичний засіб" відноситься до складу за даним винаходом. У певні інших варіантах здійснення термін "терапевтичний засіб" відноситься до засобу, відмінного від складу за даним винаходом. Терапевтичний засіб переважно являє собою засіб, про який відомо, що він є застосовним, або застосовувався, або застосовується в цей час для лікування, контролю або зменшення інтенсивності захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13, або одного або декількох симптомів, пов'язаних з ним.

Термін "терапія" відноситься до будь-якого протоколу, способу та/або засобу, які можна застосовувати в попередженні, контролі, лікуванні та/або зменшенні інтенсивності захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13 (наприклад, форм раку, запалення, аутоімунних захворювань, інфекцій, серцево-судинних захворювань, захворювань органів дихання, неврологічних захворювань і метаболічних захворювань). У певних варіантах здійснення терміни "види терапії" і "терапія" відносяться до біологічної терапії, підтримувальної терапії та/або іншим видам терапії, застосовним у попередженні, контролі, лікуванні та/або зменшенні інтенсивності захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13, відомого фахівцям у даній області, таким як медичний персонал.

Терміни "лікувати", "лікування" та "лікуючий" відносяться до зниження або зменшення прогресування, важкості та/або тривалості захворювання, опосередкованого IL-4 і/або IL-13 (наприклад, форм раку, запалення, аутоімунних захворювань, інфекцій, серцево-судинних захворювань, захворювань органів подиху, неврологічних захворювань і метаболічних захворювань), у результаті введення одного або декількох засобів терапії (у тому числі, без

обмеження, введення одного або декількох профілактичних або терапевтичних засобів, таких як склад за даним винаходом).

Терміни "варіабельна область" або "варіабельний домен" відносяться до частин легкого та важкого ланцюгів, що зазвичай містять приблизно 120-130 амінокінцевих амінокислот у важкому ланцюзі та приблизно 100-110 амінокислот у легкому ланцюзі, які значно відрізняються за послідовністю серед антитіл і використовуються у зв'язуванні та визначенні специфічності кожного конкретного антитіла до свого конкретного антигену. У цих областях, що зветься областями, які визначають комплементарність (CDR), зосереджена варіабельність послідовностей, при цьому більш висококонсервативні області варіабельного домену називають каркасними областями (FR). CDR легкого та важкого ланцюгів несуть основну відповідальність за взаємодію антитіла з антигеном. Нумерація положень амінокислот приводиться відповідно до EU-індексу згідно Kabat et al. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5<sup>th</sup> ed. ("Кабат і співавт."). В переважних варіантах здійснення варіабельна область являє собою людську варіабельну область.

#### В. Склади та компоненти складів

Як було зазначено вище, склади за даним винаходом містять біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 і буферну систему, де pH складу становить приблизно pH 7, і де склад характеризується низькою концентрацією солей з метою зниження іонної сили складу. Склади необов'язково можуть додатково містити неіоногенну поверхнево-активну речовину, цукор та/або неіоногенний стабілізатор. Було виявлено, що в складах за даним винаходом передбачені значні поліпшення в порівнянні з більш ранніми складами на основі біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13, у яких підвищення концентрації антитіла в складі часто приводить до утворення молекулярних агрегатів антитіла та утворенню видимих і не видимих неозброєним оком частинок. Зокрема, склади за даним винаходом проявляють високу стабільність відносно видимих частинок, не видимих неозброєним оком частинок, низькомолекулярних білків і високомолекулярних білків.

#### і. Біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 та їх варіанти та фрагменти

У певних варіантах здійснення склади за даним винаходом містять біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13. Біспецифічне антитіло або його варіанти або фрагменти зв'язуються або специфічно зв'язуються з IL-4 та/або IL-13. Молекули IL-4 та/або IL-13 можуть бути отримані від будь-якого виду. Молекули IL-4 та/або IL-13 переважно отримані від людини. Амінокислотні послідовності та структури білків як IL-4, так і IL-13 добре відомі в даній області техніки.

У певних ілюстративних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 являє собою гуманізоване антитіло, повністю людське антитіло або його варіант, або антиген-зв'язуючий фрагмент. Переважні біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 запобігають зв'язуванню IL-4 і IL-13 зі своїми рецепторами та інгібують біологічну активність IL-4 і IL-13.

#### VL3 антитіла hB-B13 до IL-13 (SEQ ID NO: 1)

У конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область легкого ланцюга (VL), що зв'язується з IL-13, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1 (Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані CDR; CDR1 являє собою SEQ ID NO: 7, RASEVDSYGQSYM<sup>H</sup>; CDR2 являє собою SEQ ID NO: 8, LASNLES; а CDR3 являє собою SEQ ID NO: 9, QQNAEDSR<sup>T</sup>).

#### Anti-IL13 hB-B13 VL3 (SEQ ID NO: 1):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGQSYM<sup>H</sup>WY QQKAGQPPKL  
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YCQQNAEDSR<sup>T</sup>  
TFGGGKLEI K

#### 45 VH2 антитіла hB-B13 до IL-13 (SEQ ID NO: 2)

У конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга (VH), що зв'язується з IL-13, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2 (Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані CDR; CDR1 являє собою SEQ ID NO: 10, GFSLTDSIN; CDR2 являє собою SEQ ID NO: 11, DGRID; а CDR3 являє собою SEQ ID NO: 12, DGYFPYAMDF).

## Anti-IL13 hB-B13 VH2 (SEQ ID NO: 2):

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVSGFSLT **DSSINWVRQP** PGKGLEWLGM  
IWG**DGRIDYA** DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY  
**FPYAMDFWGQ** GTSVTVSS

У конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область легкого ланцюга (VL), що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3 (Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані CDR; CDR1 являє собою SEQ ID NO: 13, HASQNIDVWLS; CDR2 являє собою SEQ ID NO: 14, KASNLHTG; CDR3 являє собою SEQ ID NO: 15, QQAHSYPFT).

VL1 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 3)

## Anti-IL4 h8D4-8 VL1 (SEQ ID NO: 3):

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTCHASQNID **VWLSWFQQKP** GNIPKLLIYK  
**ASNLHTGVPS** RFSGSGSGTG FTLTISLQ EDIATYYCQQ **AHSYPFT**FGG  
GTKLEIKR

VH1 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 4)

У конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга (VH), що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 (Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані CDR; CDR1 являє собою SEQ ID NO: 16, GYSFTSYWIH; CDR2 являє собою SEQ ID NO: 17, IDPSDGETR; а CDR3 являє собою SEQ ID NO: 18, LKEYGNYDSFYFDV).

## Anti-IL4 h8D4-8 VH1 (SEQ ID NO: 4):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM  
**IDPSDGETRL** NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
**EYGNYSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

VH2 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 5)

В іншому конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга (VH), що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5 (Підкресленням показані проведені амінокислотні заміни. Жирним шрифтом показані CDR; CDR1 являє собою SEQ ID NO: 19, GYSFTSYWIH; CDR2 являє собою SEQ ID NO: 20, IDASDGETR; а CDR3 являє собою SEQ ID NO: 21, LKEYGNYDSFYFDV).

## Anti-IL4 h8D4-8 VH2 (SEQ ID NO: 5):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYSFT **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM  
**IDASDGETRL** NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
**EYGNYSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

У деяких конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується з IL-13, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; і варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується з IL-13, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1.

В інших конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; і варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

Ще в декількох інших конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5; і варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується з IL-4, яка містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

В більш конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4 або 2 і 5; та

варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3. 1 і 3.

У найбільш конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 містить варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4; і варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3 ("лідерне антитіло"). Схематичне зображення варіанта здійснення біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13 показано на фігурі 1, а ілюстративні варіабельні області важкого та легкого ланцюгів показані на фігурі 2. Молекулярна маса лідерного антитіла, визначена за допомогою мас-спектрометрії, становить 198 кДа. Ізоелектрична точка лідерного антитіла, визначена за допомогою ізоелектричного фокусування, варіює в діапазоні від 5,8 до 6,2.

В альтернативних найбільш конкретних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять легкий ланцюг формули VL1-лінкер- VL2 та важкий ланцюг формули VH1-лінкер- VH2, де VL1 і VH1 утворюють антиген-зв'язуючий домен для IL-4, а VL2 і VH2 утворюють антиген-зв'язуючий домен для IL-13. У деяких варіантах здійснення VL1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 1; VH1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 2; VL2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 3; а VH2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 4 або 5. В альтернативних варіантах здійснення VL2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; VH2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; VL1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; а VH1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 або 5.

У деяких варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять лінкер між антиген-зв'язуючими доменами антитіла. Лінкер може являти собою лінкерну молекулу будь-якого виду. Лінкер переважно являє собою поліпептид. Лінкери можуть бути однаковими або відрізнятися один від одного в межах поліпептидного важкого ланцюга та поліпептидного легкого ланцюга та між ними. Крім того, лінкер може мати довжину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 або 20 амінокислот. Переважна пептидна лінкерна ланка для доменів важкого ланцюга, як і у випадку доменів легкого ланцюга, являє собою (G4S)<sub>2</sub>, тобто GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Найбільше переважно SEQ ID NO: 2 і 4 з'єднані першим пептидним лінкером, а SEQ ID NO: 1 і 3 з'єднані другим пептидом, де кожний з першого та другого пептидних лінкерів містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6. Кількості лінкерних ланок у важкому ланцюзі та у легкому ланцюзі можуть бути однаковими (симетричний порядок) або відрізнятися один від одного (асиметричний порядок). Пептидний лінкер переважно є досить довгим для забезпечення належного ступеня гнучкості для запобігання перешкоджання антиген-зв'язуючими компонентами активності один одного, наприклад, у результаті стеричної невідповідності, для забезпечення правильного згортання білка та, при необхідності, для надання молекулам антитіла можливості взаємодії з двома або більше, можливо, розташованими на великій відстані один від одного, рецепторами на поверхні однієї і тієї ж клітини; ще він переважно є досить коротким для надання компонентам антитіла можливості збереження стабільності у клітині. Таким чином, фахівець у даній області може без зусиль вибрати довжину, склад та/або конформацію пептидних лінкерів з метою оптимізації бажаних властивостей полівалентного антитіла.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент являють собою гуманізоване антитіло. Приклади ізотипів гуманізованих антитіл включають IgA, IgD, IgE, IgG і IgM. Біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 переважно являє собою антитіло IgG. Існують чотири форми IgG. Біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 переважно являє собою антитіло IgG4. У більш переважному варіанті здійснення даного винаходу біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 являє собою гуманізоване антитіло IgG4.

У деяких варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антиген-зв'язуючий фрагмент додатково містять константну область, наприклад, CH1, CH2, CH3 і CL.

Певні варіанти здійснення складів за даним винаходом також включають варіанти біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13 або їх антиген-зв'язуючих фрагментів. Варіанти біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13 можуть мати подібні фізико-хімічні властивості на підставі їх високої подоби та, таким чином, також включені в обсяг даного винаходу. Варіанти визначені як антитіла з амінокислотною послідовністю, яка щонайменше на 95 %, переважно щонайменше на 97 %, наприклад, щонайменше на 98 % або 99 % гомологічна послідовності біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13, здатні до конкуренції за зв'язування з поліпептидом IL-4 і/або IL-13, фрагментом поліпептиду IL-4 і/або IL-13, або епітопом IL-4, і/або IL-13. Варіанти переважно будуть зменшувати, нейтралізувати або іншим способом інгібувати біологічну активність IL-4

i/або IL-13. Визначення конкуренції за зв'язування з мішенню можна виконувати звичайними способами, відомими фахівцю в даній області. Варіанти переважно являють собою людські або гуманізовані антитіла та переважно являють собою молекули IgG4. У переважних варіантах здійснення варіант проявляє щонайменше 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичність амінокислотної послідовності з варіабельною областю важкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2, 4 і 5; та варіабельною областю легкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3. Термін "варіант" відноситься до антитіла, що містить амінокислотну послідовність, у якій одна або кілька амінокислот змінені в порівнянні з амінокислотними послідовностями біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13. Варіант може мати консервативні модифікації послідовності, у тому числі амінокислотні заміни, модифікації, додавання та делеції.

Приклади модифікацій включають, без обмеження, глікозилювання, ацетилювання, пегілювання, фосфорилювання, амідування, дериватизацію за допомогою відомих захисних/блокувальних груп, протеолітичного розщеплення та утворення зв'язків з клітинним лігандом або іншим білком. Амінокислотні модифікації можна впроваджувати в нуклеїнові кислоти, що кодують антитіла, за допомогою стандартних методик, відомих у даній області техніки, таких як сайт-спрямований мутагенез, молекулярне клонування, спрямований мутагенез з використанням олігонуклеотидів і випадковий ПЦР-опосередкований мутагенез. Консервативні амінокислотні заміни включають ті, при яких амінокислотний залишок заміщається амінокислотним залишком, що має подібні структурні або хімічні властивості. Сімейства амінокислотних залишків, що мають подібні бокові ланцюги, були визначені в рівні техніки. Ці сімейства включають амінокислоти з основними боковими ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислими боковими ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними боковими ланцюгами (наприклад, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн, триптофан), неполярними боковими ланцюгами (наприклад, гліцин, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), бета-розгалуженими боковими ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) і ароматичними боковими ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан). Фахівцю в даній області буде очевидно, що можна також застосовувати класифікації сімейств амінокислотних залишків, відмінні від той, що застосовувалась вище. Крім того, варіант може мати неконсервативні амінокислотні заміни, наприклад, заміщення амінокислоти амінокислотним залишком, що мають інші структурні або хімічні властивості. Подібні незначні зміни можуть також включати амінокислотні делеції або вставки, або обидві ці категорії. Посібник з визначення того, які амінокислотні залишки можуть бути замінені, модифіковані, вставлені або вилучені без припинення імунної активності, може бути знайдено за допомогою комп'ютерних програм, добре відомих у даній області техніки. Комп'ютерні алгоритми, такі як, серед іншого, Gap або Bestfit, відомі фахівцю в даній області, можна застосовувати для оптимального вирівнювання амінокислотних послідовностей, що підлягають порівнянню, і для визначення подібних або ідентичних амінокислотних залишків. Варіанти можуть мати такі ж або інші, більш високі або більш низькі значення афінності зв'язування в порівнянні з біспецифічним антитілом до IL-4/IL-13, але як і раніше здатні до специфічного зв'язування з IL-4 і/або IL-13 і можуть мати таку ж, більш високу або більш низьку біологічну активність в порівнянні з біспецифічним антитілом до IL-4/IL-13.

Варіанти здійснення даного винаходу також включають антиген-зв'язуючі фрагменти біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13. Терміни "антиген-зв'язуючий домен", "антиген-зв'язуюча область", "антиген-зв'язуючий фрагмент" і подібні терміни відносяться до частини антитіла (наприклад, до областей, що визначають комплементарність (CDR)), що містить амінокислотні залишки, які взаємодіють з антигеном і надають зв'язуючому засобу його специфічність та афінність до антигену. Антиген-зв'язуюча область може бути отримана від будь-яких видів тварин, таких як гризуни (наприклад, кролик, пацюк або хом'як) та люди. Антиген-зв'язуюча область переважно буде походити від людини. Необмежуючі приклади антиген-зв'язуючих фрагментів включають Fab-фрагменти, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменти, Fd-фрагменти, Fv-фрагменти, однокланові молекули Fv (scFv), dAb-фрагменти та мінімальні розпізнавальні одиниці, що складаються з амінокислотних залишків, що імітують гіперваріабельну область антитіла.

В переважних варіантах здійснення даного винаходу біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 (або його варіант, або його антиген-зв'язуючий фрагмент) буде зменшувати, нейтралізувати або іншим способом інгібувати біологічну активність IL-4 і/або IL-13 *in vivo*.

В переважних варіантах здійснення даного винаходу біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 (або їх варіанти, або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) є антагоністичними антитілами, що зменшують,



нейтралізують або іншим способом інгібують біологічну активність IL-4 і/або IL-13 *in vivo*.

Ідентифікація, виділення, отримання та визначення характеристик біспецифічних антитіл до IL-4/IL-13 або їх варіантів, або фрагментів, що зв'язуються як з IL-13, так і з IL-4, у тому числі біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3, були докладно описані в публікації по РСТ WO 2009/052081, включеної в даний документ за допомогою посилання.

Біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 (або їх варіанти, або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) переважно присутні в складах у кількості від приблизно 5 мг/мл до приблизно 200 мг/мл, наприклад, від приблизно 50 мг/мл до приблизно 150 мг/мл, від приблизно 75 мг/мл до приблизно 125 мг/мл і приблизно 100 мг/мл. Альтернативно, біспецифічні антитіла до IL-4/IL-13 (або їх варіанти, або їх антиген-зв'язуючі фрагменти) присутні в складах у кількості від приблизно 5 мг/мл до приблизно 65 мг/мл, від приблизно 66 мг/мл до приблизно 130 мг/мл, від приблизно 131 мг/мл до приблизно 200 мг/мл. Наприклад, біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 може бути присутнім у складі в кількості приблизно 5 мг/мл, приблизно 10 мг/мл, приблизно 15 мг/мл, приблизно 20 мг/мл, приблизно 25 мг/мл, приблизно 30 мг/мл, приблизно 35 мг/мл, приблизно 40 мг/мл, приблизно 45 мг/мл, приблизно 50 мг/мл, приблизно 55 мг/мл, приблизно 60 мг/мл, приблизно 65 мг/мл, приблизно 70 мг/мл, приблизно 75 мг/мл, приблизно 80 мг/мл, приблизно 85 мг/мл, приблизно 90 мг/мл, приблизно 95 мг/мл, приблизно 100 мг/мл, приблизно 105 мг/мл, приблизно 110 мг/мл, приблизно 115 мг/мл, приблизно 120 мг/мл, приблизно 125 мг/мл, приблизно 130 мг/мл, приблизно 135 мг/мл, приблизно 140 мг/мл, приблизно 145 мг/мл, приблизно 150 мг/мл, приблизно 155 мг/мл, приблизно 160 мг/мл, приблизно 165 мг/мл, приблизно 170 мг/мл, приблизно 175 мг/мл, приблизно 180 мг/мл, приблизно 185 мг/мл, приблизно 190 мг/мл, приблизно 195 мг/мл або приблизно 200 мг/мл.

В певних ілюстративних варіантах здійснення біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 є присутнім у складі в кількості приблизно 100 мг/мл. В іншому ілюстративному варіанті здійснення гуманізоване біспецифічне антитіло IgG4 до IL-4/IL-13, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4 або 2 і 5; та варіабельну область легкого ланцюга, що зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, яка містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3, є присутнім у складі в кількості приблизно 100 мг/мл.

## II. Буферні засоби, буферні системи, іонна сила та pH

Буферні засоби сприяють підтримці pH складів у діапазоні, близькому до фізіологічних умов. Буфери переважно присутні в складах у концентрації, що варіює в діапазоні від приблизно 1 мМ до приблизно 50 мМ. Придатні буферні засоби для застосування в даному винаході включають як органічні, так і неорганічні кислоти і їх солі, такі як цитратні буфери (наприклад, суміш цитрату моноватрію та цитрату динатрію, суміш лимонної кислоти та цитрату тринатрію, суміш лимонної кислоти та цитрату моноватрію і т.п.), сукцинатні буфери (наприклад, суміш бурштинової кислоти та сукцинату моноватрію, суміш бурштинової кислоти та гідроксиду натрію, суміш бурштинової кислоти та сукцинату динатрію і т.п.), тартратні буфери (наприклад, суміш винної кислоти та тартрату натрію, суміш винної кислоти та тартрату калію, суміш винної кислоти та гідроксиду натрію і т.п.), фумаратні буфери (наприклад, суміш фумарової кислоти та фумарату моноватрію, суміш фумарової кислоти та фумарату динатрію, суміш фумарату моноватрію та фумарату динатрію і т.п.), глюконатні буфери (наприклад, суміш глюконової кислоти та глюконату натрію, суміш глюконової кислоти та гідроксиду натрію, суміш глюконової кислоти та глюконату калію і т.п.), оксалатні буфери (наприклад, суміш щавлевої кислоти та оксалату натрію, суміш щавлевої кислоти та гідроксиду натрію, суміш щавлевої кислоти та оксалату калію і т.п.), лактатні буфери (наприклад, суміш молочної кислоти та лактату натрію, суміш молочної кислоти та гідроксиду натрію, суміш молочної кислоти та лактату калію і т.п.) і ацетатні буфери (наприклад, суміш оцтової кислоти та ацетату натрію, суміш оцтової кислоти та гідроксиду натрію і т.п.). Також є придатними та можуть застосовуватися фосфатні буфери, карбонатні буфери, гістидинові буфери, солі триметиламіну, такі як Tris, HEPES та інші такі відомі буфери. У складах за даним винаходом переважно застосовують комбінацію буферів, тобто два або більше буферних засобів. Комбінацію двох або більше буферів у даному документі називають буферною системою.

Склади за даним винаходом містять буферну систему. Буферна система підтримує фізіологічно прийнятний рівень pH. На додаток, буферна система бере участь у забезпеченні ізотонічності та хімічній стабільності складу. Через складність розробки стабільного складу на основі антитіла для біспецифічного антитіла кращим є застосування комбінованої буферної системи з метою отримання переваг від сприятливих ефектів двох або більше буферів. Шляхом



комбінації сприятливих ефектів двох або більше буферів можна розробити більш стабільний склад на основі антитіла.

Буферна система переважно присутня в складах у концентрації від приблизно 1 мМ до приблизно 50 мМ, наприклад, від приблизно 5 мМ до приблизно 25 мМ, від приблизно 5 мМ до приблизно 15 мМ або приблизно 10 мМ. Альтернативно, буферна система присутня в складах у концентрації від приблизно 1 мМ до приблизно 15 мМ, від приблизно 16 мМ до приблизно 30 мМ, від приблизно 31 мМ до приблизно 45 мМ або від приблизно 46 мМ до приблизно 50 мМ. Наприклад, буферна система може бути присутньою у складі в концентрації приблизно 1 мМ, приблизно 2 мМ, приблизно 3 мМ, приблизно 4 мМ, приблизно 5 мМ, приблизно 6 мМ, приблизно 7 мМ, приблизно 8 мМ, приблизно 9 мМ, приблизно 10 мМ, приблизно 11 мМ, приблизно 12 мМ, приблизно 13 мМ, приблизно 14 мМ, приблизно 15 мМ, приблизно 16 мМ, приблизно 17 мМ, приблизно 18 мМ, приблизно 19 мМ, приблизно 20 мМ, приблизно 21 мМ, приблизно 22 мМ, приблизно 23 мМ, приблизно 24 мМ, приблизно 25 мМ, приблизно 26 мМ, приблизно 27 мМ, приблизно 28 мМ, приблизно 29 мМ, приблизно 30 мМ, приблизно 31 мМ, приблизно 32 мМ, приблизно 33 мМ, приблизно 34 мМ, приблизно 35 мМ, приблизно 36 мМ, приблизно 37 мМ, приблизно 38 мМ, приблизно 39 мМ, приблизно 40 мМ, приблизно 41 мМ, приблизно 42 мМ, приблизно 43 мМ, приблизно 44 мМ, приблизно 45 мМ, приблизно 46 мМ, приблизно 47 мМ, приблизно 48 мМ, приблизно 49 мМ і приблизно 50 мМ. Буферна система більш переважно присутня у складі в концентрації від приблизно 5 мМ до приблизно 15 мМ і ще більш переважно від приблизно 8 мМ до приблизно 12 мМ. У найбільш переважному варіанті здійснення буферна система присутня в концентрації приблизно 10 мМ.

Буферна система переважно містить Tris-буфер і фосфатний буфер. Tris-буфер переважно присутній у складах в концентрації від приблизно 1 до приблизно 5 мМ. Наприклад, Tris-буфер може бути присутнім у складі в концентрації приблизно 1 мМ, приблизно 2 мМ, приблизно 3 мМ, приблизно 4 мМ або приблизно 5 мМ. Tris-буфер більш переважно присутній у складах в концентрації від приблизно 2 мМ до приблизно 4 мМ і ще більш переважно від приблизно 3 мМ до приблизно 4 мМ. У найбільш переважному варіанті здійснення Tris-буфер присутній у концентрації приблизно 3,7 мМ.

Фосфатний буфер переважно присутній у складах в концентрації від приблизно 1 до приблизно 10 мМ. Наприклад, фосфатний буфер може бути присутнім у складах в концентрації приблизно 1 мМ, приблизно 2 мМ, приблизно 3 мМ, приблизно 4 мМ, приблизно 5 мМ, приблизно 6 мМ, приблизно 7 мМ, приблизно 8 мМ, приблизно 9 мМ або приблизно 10 мМ. Фосфатний буфер більш переважно присутній у складах в концентрації від приблизно 3 мМ до приблизно 8 мМ і ще більш переважно від приблизно 5 мМ до приблизно 7 мМ. У найбільш переважному варіанті здійснення фосфатний буфер присутній у концентрації приблизно 6,3 мМ.

У найбільш переважному варіанті здійснення даного винаходу буферна система містить Tris-буфер в концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер в концентрації приблизно 6,3 мМ. Дана комбінація Tris-буфера та фосфатного буфера в буферній системі є досить незвичайною та невідома з рівня техніки.

Також переважно, щоб буферна система була присутня в складах в низькій концентрації, тобто приблизно 15 мМ або менше, з метою зниження іонної сили складу. Це обумовлене тим, з підвищенням іонної сили складу підвищуються кінетичні параметри агрегації антитіла. З метою поліпшення стабільності складу необхідним є зниження агрегації антитіла та/або швидкості агрегації антитіла.

В певних варіантах здійснення складу за даним винаходом мають рН близько рН 7. рН складів переважно варіює в діапазоні від приблизно 5,0 до приблизно 8,0. Наприклад, рН складів може становити приблизно 5,0, приблизно 5,1, приблизно 5,2, приблизно 5,3, приблизно 5,4, приблизно 5,5, приблизно 5,6, приблизно 5,7, приблизно 5,8, приблизно 5,9, приблизно 6,0, приблизно 6,1, приблизно 6,2, приблизно 6,3, приблизно 6,4, приблизно 6,5, приблизно 6,6, приблизно 6,7, приблизно 6,8, приблизно 6,9, приблизно 7,0, приблизно 7,1, приблизно 7,2, приблизно 7,3, приблизно 7,4, приблизно 7,5, приблизно 7,6, приблизно 7,7, приблизно 7,8, приблизно 7,9 і приблизно 8,0. рН складів більш переважно може варіювати в діапазоні від приблизно 6,5 до приблизно 7,5. В найбільш переважному варіанті здійснення рН становить приблизно 7,0. Склади проявляють високу стабільність відносно видимих часток, не видимих неозброєним оком часток, низькомолекулярних білків і високомолекулярних білків, якщо рН складів становить приблизно рН 7. рН складу можна визначити будь-якими способами, відомими фахівцям у даній області. Переважним способом вимірювання рН є застосування рН-метра з мікроелектродом. рН складу можна регулювати будь-якими способами, відомими в даній області техніки. Переважними хімічними речовинами для зміни рН складів є соляна кислота (HCl) і гідроксид натрію (NaOH).

У певних варіантах здійснення складу за даним винаходом мають рН вище ізоелектричної точки (pI) антитіла. Ізоелектричною точкою є рН, при якому визначена молекула або поверхня не несе сумарного електричного заряду. pI біспецифічного антитіла можна визначити будь-якими способами, відомими фахівцям у даній області. pI біспецифічного антитіла переважно визначають за допомогою ізоелектричного фокусування в денатуруючих умовах. pI біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, що містить варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4; і варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3, становить 5,8-6,2.

### III. Неіоногенні поверхнево-активні речовини

Склади за даним винаходом необов'язково можуть додатково містити неіоногенну поверхнево-активну речовину. Поверхнево-активні речовини є хімічними сполуками, що стабілізують біологічні молекули та/або основні фармацевтичні наповнювачі в складі. Поверхнево-активні речовини, як правило, захищають молекули та наповнювачі від впливів, що індукуються на межі розподілу повітря/розчин, і впливів, що індукуються на поверхні розчину, які в інших випадках можуть привести до агрегації молекул. Поверхнево-активні речовини також запобігають утворенню видимих і не видимих неозброєним оком часток.

Неіоногенна поверхнево-активна речовина переважно присутня у складах у концентрації від приблизно 0,01 % до приблизно 1 % (вага/об'єм), наприклад, від приблизно 0,01 % до приблизно 0,5 %, від приблизно 0,01 % до приблизно 0,3 % або від приблизно 0,01 % до приблизно 0,2 %. Альтернативно, неіоногенна поверхнево-активна речовина присутня в складах у концентрації від приблизно 0,01 % до приблизно 0,05 % (вага/об'єм), від приблизно 0,06 % до приблизно 0,10 % (вага/об'єм), від приблизно 0,11 % до приблизно 0,15 % (вага/об'єм), від приблизно 0,16 % до приблизно 0,20 % (вага/об'єм), від приблизно 0,20 % до приблизно 0,30 % (вага/об'єм), від приблизно 0,30 % до приблизно 0,40 % (вага/об'єм), від приблизно 0,40 % до приблизно 0,50 % (вага/об'єм), від приблизно 0,50 % до приблизно 0,60 % (вага/об'єм), від приблизно 0,60 % до приблизно 0,70 % (вага/об'єм), від приблизно 0,70 % до приблизно 0,80 % (вага/об'єм), від приблизно 0,80 % до приблизно 0,90 % (вага/об'єм) або від приблизно 0,90 % до приблизно 1,0 % (вага/об'єм). Наприклад, неіоногенна поверхнево-активна речовина може бути присутня в складах у кількості приблизно 0,01 % (вага/об'єм), приблизно 0,02 % (вага/об'єм), приблизно 0,03 % (вага/об'єм), приблизно 0,04 % (вага/об'єм), приблизно 0,05 % (вага/об'єм), приблизно 0,06 % (вага/об'єм), приблизно 0,07 % (вага/об'єм), приблизно 0,08 % (вага/об'єм), приблизно 0,09 % (вага/об'єм), приблизно 0,1 % (вага/об'єм), приблизно 0,2 % (вага/об'єм), приблизно 0,3 % (вага/об'єм), приблизно 0,4 % (вага/об'єм), приблизно 0,5 % (вага/об'єм), приблизно 0,6 % (вага/об'єм), приблизно 0,7 % (вага/об'єм), приблизно 0,8 % (вага/об'єм), приблизно 0,9 % (вага/об'єм) і приблизно 1 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення неіоногенна поверхнево-активна речовина присутня в складах у кількості від приблизно 0,05 % до приблизно 0,2 % (вага/об'єм).

Приклади поверхнево-активних речовин включають, без обмеження, полісорбати, гліцерин, двохосновні карбонові кислоти, щавлеву кислоту, бурштинову кислоту, форми фумарової кислоти, форми фталевої кислоти та їх комбінації. Фахівці в даній області інформовані про те, що можна застосовувати і інші неіоногенні поверхнево-активні речовини, оскільки вони є фармацевтично прийнятними, тобто придатними для введення суб'єктам. Неіоногенна поверхнево-активна речовина переважно являє собою полісорбат. Приклади полісорбатів включають полісорбат 20, полісорбат 40, полісорбат 60, полісорбат 65 та полісорбат 80. Неіоногенна поверхнево-активна речовина найбільш переважно являє собою полісорбат 80.

В ілюстративних варіантах здійснення полісорбат 80 присутній в складах у кількості від приблизно 0,01 % до приблизно 1 % (вага/об'єм). Наприклад, полісорбат 80 може бути присутнім в складах у кількості приблизно 0,01 % (вага/об'єм), приблизно 0,02 % (вага/об'єм), приблизно 0,03 % (вага/об'єм), приблизно 0,04 % (вага/об'єм), приблизно 0,05 % (вага/об'єм), приблизно 0,06 % (вага/об'єм), приблизно 0,07 % (вага/об'єм), приблизно 0,08 % (вага/об'єм), приблизно 0,09 % (вага/об'єм), приблизно 0,1 % (вага/об'єм), приблизно 0,2 % (вага/об'єм), приблизно 0,3 % (вага/об'єм), приблизно 0,4 % (вага/об'єм), приблизно 0,5 % (вага/об'єм), приблизно 0,6 % (вага/об'єм), приблизно 0,7 % (вага/об'єм), приблизно 0,8 % (вага/об'єм), приблизно 0,9 % (вага/об'єм) і приблизно 1 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення полісорбат 80 присутній в складах у кількості від приблизно 0,03 % до приблизно 0,2 % (вага/об'єм). Наприклад, полісорбат 80 може бути присутнім у кількості від приблизно 0,01 % до приблизно 1 % (вага/об'єм), від приблизно 0,02 % до приблизно 0,5 % (вага/об'єм) і від приблизно 0,03 % до приблизно 0,2 % (вага/об'єм). У найбільш переважних варіантах здійснення даного винаходу полісорбат 80 присутній в складах у кількості 0,2 % (вага/об'єм).

### IV. Цукри

Склади за даним винаходом необов'язково можуть додатково містити цукор. Цукри звичайно застосовують у якості стабілізатора для високомолекулярних білків, або в якості кріопротектора, або в якості ліопротектора.

Цукор переважно присутній в складах у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 10 % (вага/об'єм), наприклад, від приблизно 2 % до приблизно 8 % (вага/об'єм), від приблизно 3 % до приблизно 7 % (вага/об'єм), від приблизно 4 % до приблизно 6 % (вага/об'єм) або приблизно 5 % (вага/об'єм). Альтернативно, цукор присутній в складах у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм), від приблизно 3 % до приблизно 6 % (вага/об'єм) або від приблизно 6 % до приблизно 10 % (вага/об'єм). Наприклад, цукор може бути присутнім в складах у кількості приблизно 1 % (вага/об'єм), приблизно 2 % (вага/об'єм), приблизно 3 % (вага/об'єм), приблизно 4 % (вага/об'єм), приблизно 5 % (вага/об'єм), приблизно 6 % (вага/об'єм), приблизно 7 % (вага/об'єм), приблизно 8 % (вага/об'єм), приблизно 9 % (вага/об'єм) або приблизно 10 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення цукор присутній в складах у кількості від приблизно 3 % до приблизно 7 % (вага/об'єм) та більш переважно в кількості приблизно 5 %.

Приклади цукрів включають, без обмеження, моносахариди, дисахариди та полісахариди. Приклади сахаридів включають глюкозу, цукрозу, мальтозу, трегалозу, декстрозу, ксиліт, фруктозу та маніт. Фахівці в даній галузі інформовані про те, що можна застосовувати й інші цукри, оскільки вони є фармацевтично прийнятними, тобто придатними для введення суб'єктам. Цукор переважно являє собою дисахарид. Цукор більш переважно являє собою цукрозу.

У певних варіантах здійснення цукроза присутня в складах у кількості приблизно 1 % - 10 % (вага/об'єм). Наприклад, цукроза може бути присутньою у складі в кількості приблизно 1 % (вага/об'єм), приблизно 2 % (вага/об'єм), приблизно 3 % (вага/об'єм), приблизно 4 % (вага/об'єм), приблизно 5 % (вага/об'єм), приблизно 6 % (вага/об'єм), приблизно 7 % (вага/об'єм), приблизно 8 % (вага/об'єм), приблизно 9 % (вага/об'єм) або приблизно 10 % (вага/об'єм). Цукроза переважно може бути присутньою у кількості від приблизно 3 % до приблизно 7 % (вага/об'єм) або від приблизно 4 % до приблизно 6 % (вага/об'єм). Цукроза найбільш переважно присутня в складах у кількості приблизно 5 % (вага/об'єм).

#### V. Неіоногенні стабілізатори

Склади за даним винаходом необов'язково можуть додатково містити неіоногенний стабілізатор. Стабілізатори відносяться до широкої категорії наповнювачів, які можуть варіювати за функцією від об'ємоутворюючого засобу до добавки, що солюбілізує терапевтичний засіб або сприяє запобіганню денатурації або прилипанню до стінки ємності. Стабілізатори також мінімізують утворення високомолекулярних білків.

Неіоногенний стабілізатор переважно присутній в складах у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 10 % (вага/об'єм), наприклад, від приблизно 2 % до приблизно 8 % (вага/об'єм), від приблизно 2 % до приблизно 5 % (вага/об'єм), від приблизно 2 % до приблизно 4 % (вага/об'єм) або приблизно 3 % (вага/об'єм). Альтернативно, неіоногенний стабілізатор присутній в складах у концентрації від приблизно 1 % до приблизно 2 % (вага/об'єм), наприклад, від приблизно 2 % до приблизно 4 % (вага/об'єм), від приблизно 4 % до приблизно 6 % (вага/об'єм), від приблизно 6 % до приблизно 8 % (вага/об'єм) або від приблизно 8 % до приблизно 10 % (вага/об'єм). Наприклад, неіоногенний стабілізатор може бути присутнім в складах у кількості приблизно 1 % (вага/об'єм), приблизно 2 % (вага/об'єм), приблизно 3 % (вага/об'єм), приблизно 4 % (вага/об'єм), приблизно 5 % (вага/об'єм), приблизно 6 % (вага/об'єм), приблизно 7 % (вага/об'єм), приблизно 8 % (вага/об'єм), приблизно 9 % (вага/об'єм) або приблизно 10 % (вага/об'єм). В конкретних варіантах здійснення неіоногенний стабілізатор присутній в складах у кількості від приблизно 1 % до приблизно 5 % (вага/об'єм), більш переважно від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм) і найбільше переважно приблизно 3 % (вага/об'єм).

Приклади стабілізаторів включають, без обмеження, багатоатомні сахароспирти; амінокислоти, такі як пролін, аргінін, лізин, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аланін, орнітин, L-лейцин, 2-фенілаланін, глутамінова кислота, треонін і т. п.; органічні цукри або сахароспирти, такі як лактоза, трегалоza, стахіоза, арабіт, еритрит, маніт, сорбіт, ксиліт, рибіт, міоїнозит, галактит, гліцерин і т. п., у тому числі цикліт, такі як інозит; поліетиленгліколь; полімери амінокислот; сірковмісні відновники, такі як сечовина, глутатіон, тіоктова кислота, тіогліколят натрію, тіогліцерин, α-монотіогліцерин та тіосульфат натрію; низькомолекулярні поліпептиди (тобто, що мають < 10 залишків); білки, такі як людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон, сахариди, моносахариди, такі як ксилоза, маноза, фруктоза, глюкоза; дисахариди, такі як лактоза, мальтоза та цукроза; трисахариди, такі як рафіноза; полісахариди, такі як декстран, і т. п. Фахівці в даній галузі інформовані про те, що можна застосовувати й інші

неіоногенні стабілізатори, оскільки вони є фармацевтично прийнятними, тобто придатними для введення суб'єктам. Неіоногенний стабілізатор переважно являє собою амінокислоту. Неіоногенний стабілізатор більш переважно являє собою пролін або гліцин. Неіоногенний стабілізатор найбільш переважно являє собою пролін. Альтернативно, неіоногенний стабілізатор являє собою маніт.

У певних варіантах здійснення пролін присутній в складах у кількості приблизно 1 % - 10 % (вага/об'єм). Наприклад, пролін може бути присутнім у складі в кількості приблизно 1 % (вага/об'єм), приблизно 2 % (вага/об'єм), приблизно 3 % (вага/об'єм), приблизно 4 % (вага/об'єм), приблизно 5 % (вага/об'єм), приблизно 6 % (вага/об'єм), приблизно 7 % (вага/об'єм), приблизно 8 % (вага/об'єм), приблизно 9 % (вага/об'єм) або приблизно 10 % (вага/об'єм). Пролін переважно може бути присутнім у кількості від приблизно 1 % до приблизно 5 % (вага/об'єм) або від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм). Пролін найбільш переважно присутній в складах у кількості приблизно 3 % (вага/об'єм).

У певних альтернативних варіантах здійснення маніт присутній в складах у кількості приблизно 1 % - 10 % (вага/об'єм). Наприклад, маніт може бути присутнім у складі в кількості приблизно 1 % (вага/об'єм), приблизно 2 % (вага/об'єм), приблизно 3 % (вага/об'єм), приблизно 4 % (вага/об'єм), приблизно 5 % (вага/об'єм), приблизно 6 % (вага/об'єм), приблизно 7 % (вага/об'єм), приблизно 8 % (вага/об'єм), приблизно 9 % (вага/об'єм) або приблизно 10 % (вага/об'єм). Маніт переважно може бути присутнім у кількості від приблизно 1 % до приблизно 5 % (вага/об'єм) або від приблизно 1 % до приблизно 3 % (вага/об'єм). Маніт найбільш переважно присутній в складах у кількості приблизно 3 % (вага/об'єм).

#### V. Інші наповнювачі

Крім того, склад за даним винаходом необов'язково можуть додатково містити інші наповнювачі, у тому числі, без обмеження, воду для ін'єкцій, розріджувачі, солубілізуювальні засоби, пом'якшуючі засоби, додаткові буфери, неорганічні або органічні солі, антиоксиданти, консерванти, об'ємоутворюючі засоби, хелатоутворювачі, засоби, що регулюють тонічність, і т. п. Переважно, однак, щоб склад за даним винаходом не містив інших наповнювачів, за винятком описаних вище. Інші фармацевтично прийнятні носії, наповнювачі або стабілізатори, такі як описані в Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980), можуть бути включені до складу за умови, що вони не впливають на бажані характеристики складу. У конкретному варіанті здійснення склад практично не містить консервантів, хоча в альтернативних варіантах здійснення при необхідності можна додавати консерванти. Наприклад, у ліофілізованих складах можуть бути включені кріопротектори або ліопротектори.

#### VI. Рідкі або ліофілізовані склад

Склади за даним винаходом можуть являти собою рідкі склад або ліофілізовані склад. Склади переважно являють собою рідкі склад. Рідкі склад більш переважно є готовими для ін'єкції. Альтернативно, склад можуть являти собою ліофілізовані порошки. Ліофілізовані порошки переважно є готовими для об'єднання з розчинником безпосередньо перед введенням.

#### VII. Ілюстративні склад

В одному ілюстративному варіанті здійснення даного винаходу даний винахід передбачає рідкий склад на основі антитіла, придатний для підшкірного введення, при цьому склад містить:

приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3;

приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ;

приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80;

приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та

приблизно 3 % (вага/об'єм) проліну;

де рН складу становить приблизно рН 7.

В іншому ілюстративному варіанті здійснення даного винаходу даний винахід передбачає рідкий склад на основі антитіла, придатний для підшкірного введення, при цьому склад містить:

приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3;

приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ;

приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80;

приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та  
приблизно 3 % (вага/об'єм) маніту;  
де рН складу становить приблизно рН 7.

В альтернативному ілюстративному варіанті здійснення даного винаходу даний винахід  
5 передбачає стабільний ліофілізований склад на основі антитіла, придатний для підшкірного введення, при цьому склад містить:

приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3;

приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ;

приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80;

приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та

приблизно 3 % (вага/об'єм) проліну;

де рН складу становить приблизно рН 7.

В іншому альтернативному ілюстративному варіанті здійснення даного винаходу даний винахід передбачає стабільний ліофілізований склад на основі антитіла, придатного для підшкірного введення, при цьому склад містить:

приблизно 100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антиген-зв'язуючого фрагмента, де антитіло або його антиген-зв'язуючий фрагмент містять варіабельну область важкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та варіабельну область легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3;

приблизно 10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ;

приблизно 0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80;

приблизно 5 % (вага/об'єм) цукрози та

приблизно 3 % (вага/об'єм) маніту;

де рН складу становить приблизно рН 7.

#### VII. Стабільність

Склади за даним винаходом є стабільними при 2-8 °С протягом щонайменше приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 місяців або довше. В ілюстративних варіантах здійснення вони є стабільними при 2-8 °С протягом щонайменше приблизно 6 місяців або довше. В інших ілюстративних варіантах здійснення вони є стабільними при 2-8 °С протягом щонайменше приблизно 9 місяців. У додаткових ілюстративних варіантах здійснення вони є стабільними при 2-8 °С протягом щонайменше приблизно 1 року або довше, більш переважно протягом приблизно 2 років і ще більш переважно протягом приблизно 3 років.

#### С. Способи введення

У певних варіантах здійснення даного винаходу склади прийнятні для парентерального, внутрішньовенного, внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, підшкірного введення або їх комбінації. Склади за даним винаходом прийнятні для доставки за допомогою ряду методик. У переважних варіантах здійснення даного винаходу склад вводять підшкірно. Наприклад, переважно, щоб склади, що містять 100 мг/мл біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13, вводили підшкірно. Отже, склади переважно є стерильними. Способи додання складам стерильності добре відомі в даній галузі техніки та включають, наприклад, фільтрацію через стерильні фільтраційні мембрани або стерилізацію інгредієнтів складу, за винятком антитіл, в автоклаві при приблизно 120 °С протягом приблизно 30 хвилин.

#### Д. Дозування та лікарські форми

Ефективні дози складів за даним винаходом варіюють залежно від багатьох різних факторів, у тому числі від способу введення, цільової ділянки, фізіологічного стану суб'єкта, без відмінності у відношенні того, чи є суб'єкт людиною або твариною, інших ліків, що вводяться, і того, чи є лікування профілактичним або терапевтичним. Зазвичай суб'єкт є людиною, але також можна лікувати відмінних від людини ссавців, у тому числі трансгенних ссавців. Може існувати необхідність у підбиранні лікувальних дозувань для оптимізації безпеки та ефективності. Доза переважно варіює в діапазоні 100-200 мг/флакон.

Склади за даним винаходом можна вводити кілька разів. Інтервали між окремими введеннями доз можуть становити добу, тиждень, два тижні, місяць або рік. Інтервали також можуть бути нерегулярними. У деяких способах дозування коректують для досягнення певної концентрації зв'язуючого засобу, такого як антитіло, у плазмі крові. Дозування та частота будуть

варіювати залежно від періоду напіввиведення біспецифічного антитіла до IL-4/IL-13 з організму суб'єкта. Як правило, людські антитіла демонструють найбільший період напіввиведення, а після них ідуть гуманізовані антитіла, химерні антитіла та антитіла, відмінні від людських.

У додаткових варіантах здійснення даний винахід передбачає стандартну фармацевтичну форму, що містить терапевтично ефективну кількість складу за даним винаходом для лікування одного або декількох захворювань у суб'єкта за допомогою введення лікарської форми суб'єкту. У переважному варіанті здійснення суб'єкт є людиною. Людина може бути дорослою або може бути дитиною. Термін "стандартна фармацевтична форма" відноситься до фізично дискретної одиниці, прийнятної як стандартне дозування для суб'єктів, що підлягають лікуванню, при цьому кожна одиниця містить попередньо визначену кількість активної сполуки, розраховану для викликання бажаного терапевтичного/профілактичного ефекту, разом з цитратним буфером з необхідним рН.

Стандартна лікарська форма може являти собою ємність, що містить склад. Прийнятні ємності включають, без обмеження, запаяні ампули, флакони, бутелі, шприци та пробірки. Ємності можуть бути виконані з ряду матеріалів, таких як скло або пластик, і можуть мати стерильний вхідний отвір (наприклад, ємність може являти собою флакон, що має пробку, яку можна проколоти голкою для підшкірних ін'єкцій). В переважному варіанті здійснення ємність являє собою флакон. У цілому, ємність повинна підтримувати стерильність і стабільність складу.

В конкретних варіантах здійснення складу розфасовані у флакони на 7, 10, 15 або 20 мл, виготовлені з прозорого безбарвного скла типу I, закриті пробкою (бромбутил, покритий фторполімером) і запечатані обтискним ковпачком з фланцем (поліпропілен).

У конкретному варіанті здійснення складу вторинно розфасовані в ємність, таку як картонна коробка, що захищає флакони від світла.

Склади, що підлягають застосуванню для введення *in vivo*, повинні бути стерильними. Цього можна досягти, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани. Наприклад, рідкіклади за даним винаходом можна стерилізувати шляхом фільтрації за допомогою фільтра на 0,2 мкм або 0,22 мкм.

#### Е. Способи лікування

У даному документі додатково передбачені способи лікування захворювання або порушення, опосередкованого IL-4 та/або IL-13, при цьому способи включають уведення суб'єкту складу за даним винаходом. У певних варіантах здійснення захворювання, опосередковане IL-4 та/або IL-13, являє собою форми раку, запалення, аутоімунні захворювання, інфекції, серцево-судинні захворювання, захворювання органів дихання, неврологічні захворювання та метаболічні захворювання.

Склади за даним винаходом можна застосовувати для лікування, пригнічення або попередження захворювання, такого як алергічне захворювання, захворювання, опосередковане Th2, захворювання, опосередковане IL-13, захворювання, опосередковане IL-4, та/або захворювання, опосередковане IL-4/IL-13. Приклади таких захворювань включають лімфому Ходжкіна, астму, алергічну астму, atopічний дерматит, atopічну алергію, неспецифічний виразковий коліт, склеродермію, алергічний риніт, COPD3, ідіопатичний легеневий фіброз, хронічне відторгнення трансплантата, блеомицин-індукований легеневий фіброз, радіаційно-індукований легеневий фіброз, гранулема легенів, прогресуючий системний склероз, шистосомоз, фіброз печінки, рак нирки, лімфому Беркітта, лімфому Ходжкіна, неходжкінську лімфому, синдром Сезарі, астму, септичний артрит, герпетичний дерматит, хронічну ідіопатичну кропивницю, неспецифічний виразковий коліт, склеродермію, гіпертрофічне рубцювання, хворобу Уіппла, доброякісну гіперплазію простати, легеневе порушення, у якому відіграє роль рецептор IL-4, стан, у якому відіграє роль руйнування епітеліального бар'єра, опосередковане рецепторами IL-4, порушення з боку травної системи, у якому відіграє роль рецептор IL-4, алергічну реакцію на ліки, хворобу Кавасакі, серповидноклітинну анемію, синдром Черджа-Стросс, хворобу Грейвса, прееклампсію, синдром Шегрена, аутоімунний лімфопроліферативний синдром, аутоімунну гемолітичну анемію, стравохід Барретта, аутоімунний увеїт, туберкульоз, муковісцидоз, алергічний бронхолегеневий мікоз, хронічне обструктивне захворювання легенів, блеомицин-індуковані пневмопатію та фіброз, легеневий альвеолярний протеїноз, респіраторний дистрес-синдром дорослих, саркоїдоз, синдром гіперпродукції IgE, ідіопатичний гіпереозинофільний синдром, аутоімунну пухирчатку, звичайну пухирчатку, бульозний пемфігоїд, важку міастенію, синдром хронічної втоми, нефроз.

Термін "алергічне захворювання" відноситься до патологічного стану, при якому в пацієнта проявляється гіперчутливість до речовини, яка зазвичай є неімуногенною, і формується імунна реакція на неї. Алергічне захворювання, як правило, характеризується активацією гладких

клітин за допомогою IgE, що приводить у результаті до запальної реакції (наприклад, локальної реакції, системної реакції), яка може привести до появи полегшених симптомів, таких як ринорея, до небезпечного для життя анафілактичного шоку та до смерті. Приклади алергічних захворювань включають, без обмеження, алергічний риніт (наприклад, поліноз), астму (наприклад, алергічну астму), алергічний дерматит (наприклад, екзему), контактний дерматит, харчову алергію та кропивницю (круп).

Термін "захворювання, опосередковане Th2" відноситься до захворювання, при якому патологію викликає (повністю або частково) імунна відповідь (імунна відповідь Th2-типу), регульована CD4<sup>+</sup>T-лімфоцитами Th2, для яких характерне продукування IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13. Імунна відповідь Th2-типу пов'язана з виробленням певних цитокінів (наприклад, IL-4, IL-13) та антитіл певних класів (наприклад, IgE), а також пов'язана з гуморальним імунітетом. Захворювання, опосередковані Th2, характеризуються наявністю підвищених рівнів Th2-цитокінів (наприклад, IL-4, IL-13) та/або антитіл певних класів (наприклад, IgE) і включають, наприклад, алергічні захворювання (наприклад, алергічний риніт, atopічний дерматит, астму (наприклад, atopічну астму), алергічне захворювання дихальних шляхів (AAD), анафілактичний шок, кон'юнктивіт), аутоімунні порушення, асоційовані з підвищеними рівнями IL-4 та/або IL-13 (наприклад, ревматоїдний артрит, реакцію "трансплантат проти хазяїна", захворювання нирок (наприклад, нефротичний синдром, волчаковий нефрит)), та інфекції, асоційовані з підвищеними рівнями IL-4 та/або IL-13 (наприклад, вірусні, паразитарні, грибові (наприклад, *C. albicans*) інфекції). Певні форми раку (наприклад, В-клітинна лімфома, Т-клітинна лімфома, множинна мієлома, рак голови та шиї, рак молочної залози та рак яєчників) асоційовані з підвищеними рівнями IL-4 та/або IL-13 або асоційовані з проліферацією ракових клітин, індукованою IL-4 та/або індукованою IL-13. Ці форми раку можна лікувати, пригнічувати або попереджати за допомогою складів за даним винаходом.

Термін "рак" відноситься до фізіологічного стану в ссавців, зокрема, у людей, який зазвичай характеризується нерегульованим ростом клітин, або описує його. Приклади раку включають, без обмеження, карциному, лімфому, бластоми, саркому та лейкози.

Термін "аутоімунне захворювання" відноситься до доброякісного захворювання або порушення, що виникає від і спрямоване проти власних тканин індивідуума. Приклади аутоімунних захворювань або порушень включають, без обмеження, запальні реакції, такі як запальні захворювання шкіри, що включають псоріаз і дерматит; алергічні стани, такі як екзема та астма; інші стани, пов'язані з інфільтрацією Т-клітинами та хронічними запальними реакціями; атеросклероз; цукровий діабет (наприклад, цукровий діабет I типу або інсулінозалежний цукровий діабет); розсіяний склероз і запальне порушення з боку центральної нервової системи (CNS).

У певних варіантах здійснення складу за даним винаходом можна вводити в комбінації з одним або декількома засобами терапії (наприклад, засобами терапії, що не є складами за даним винаходом, які в цей час вводять для попередження, лікування, контролю та/або зменшення інтенсивності захворювання, опосередкованого IL-4 та/або IL-13. Використання терміна "у комбінації" не обмежує порядок, в якому засіб терапії вводять суб'єкту. Перший засіб терапії можна вводити до (наприклад, за 1 хвилину, 45 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів) введення другого засобу терапії суб'єкту, що мав, що має захворювання, опосередковане IL-4 та/або IL-13, або схильному до захворювання, одночасно з ним або після нього (наприклад, через 1 хвилину, 45 хвилин, 30 хвилин, 45 хвилин, 1 годину, 2 години, 4 години, 6 годин, 12 годин, 24 години, 48 годин, 72 години, 96 годин, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні, 4 тижні, 5 тижнів, 6 тижнів, 8 тижнів або 12 тижнів). Будь-який додатковий засіб терапії можна вводити з іншими додатковими засобами терапії в будь-якому порядку. Необмежуючі приклади засобів терапії, які можна вводити в комбінації з антитілом за даним винаходом, включають схвалені протизапальні засоби, наведені у Фармакопеї США та/або в "Настільному довіднику лікаря".

#### Г. Набори

Певні варіанти здійснення даного винаходу включають набір, що містить склад за даним винаходом. Набір може додатково містити одну або кілька ємностей, що містять фармацевтично прийнятні наповнювачі, і включати інші матеріали, бажані з комерційної точки зору та точки зору користувача, у тому числі фільтри, голки та шприци. Разом з наборами можуть бути надані інструкції, що зазвичай включені в комерційні упаковки терапевтичних, профілактичних або діагностичних продуктів, у яких міститься інформація, наприклад, про показання, застосування, дозування, виготовлення, введення, протипоказання та/або запобіжні заходи щодо застосування таких терапевтичних, профілактичних або діагностичних продуктів.

## Приклади

Як засіб ілюстрації даного винаходу наведені наступні приклади. Приклади не призначені будь-яким чином обмежувати обсяг даного винаходу. У цілому при здійсненні на практиці даного винаходу застосовують, якщо не зазначене інше, традиційні техніки фармацевтичного складання, хімії, молекулярної біології, технології рекомбінантних ДНК, імунології, наприклад технології з використанням антитіл, і стандартні техніки отримання поліпептидів, які описані, наприклад, в Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), volume 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), Eds.: McCafferty J. et al., Humana Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); и Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

У прикладах 2-6 використовуються наступні скорочення:

BD: біотехнологічна розробка

BsAb: біспецифічне антитіло

DLS: динамічне розсіювання світла

DoE: план експерименту

DP: лікарський препарат

DS: лікарська речовина

DSC: диференційна сканувальна калориметрія

FCM: Мікроскопія в проточній комірці

FDS: складена лікарська речовина

FT-IR: піддане Фур'є-перетворенню - інфрачервона область

HAP: хроматографія на гідроксіапатиті

HDPE: поліетилен високої щільності

HMW: високомолекулярна сполука

HPLC: високоефективна рідинна хроматографія

IEF: ізоелектрофокусування

IgG: імуноглобулін G

IL: інтерлейкін

kDa: кілодальтон

LMW: низькомолекулярна сполука

Nd: не визначене

PEG: поліетиленгліколь

PES: поліетерсульфон

PS80: полісорбат 80

PVDF: полівінілідендифторид

об./хв.: обертів на хвилину

SC: підшкірне

SDS-PAGE: електрофорез з додецилсульфатом натрію та поліакриламідним гелем

SEC: ексклюзійна хроматографія

SLS: статичне розсіювання світла

Sq: достатня кількість

TGA: термогравіметричний аналіз

UF/DF: ультрафільтрація/діафільтрація

USP: фармакопея Сполучених Штатів Америки

UV-Vis: ультрафіолетова та видима область спектра

Вага/об'єм: вага/об'єм

WFI: вода для ін'єкцій

XRPD: рентгенівська порошкова дифрактометрія

Гуманізоване біспецифічне антитіло IgG4 до IL-4/IL-13, що містить варіабельну область важкого ланцюга, яка зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, і варіабельну область легкого ланцюга, який зв'язується як з IL-13, так і з IL-4, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3, ("лідерне антитіло") використовували в наступних прикладах для того, щоб визначити оптимальні умови складання.

Метою наступних досліджень складів (приклади 2-6) було вивчити поведінку лідерного антитіла в розчині та у висушеному за допомогою сублімаційного сушіння стані (тобто виявити основні шляхи розпаду) і визначити прийнятні буферні системи для регулювання pH і добавки, які забезпечують високу стабільність лідерного антитіла при приблизно 100 мг/мл, для подальшої розробки складу.



Далі показані лікарські речовини, використані в прикладах 2-6.

Лідерне антитіло після стадії НАР-очищення (останньої стадії послідовної обробки):

партія № RSN0169 (дослідження № P5-P6):

буфер складу: натрій-фосфатний буфер, 75 мМ, рН 6,7;

концентрація: 10,4 мг/мл;

партії №№ RSN0169-SZW 320, 326 і 327 (дослідження № P7-P13):

буфер складу: натрій-фосфатний буфер, 59 мМ, рН 6,9;

концентрація: 4,5 мг/мл;

партія № RSN0169-SZW 330 (дослідження № P14):

буфер складу: натрій-фосфатний буфер, 55 мМ, NaCl, 20 мМ, рН 6,8;

концентрація: 4,4 мг/мл і

партія № RSN0152 (дослідження № P15-P21)

буфер складу: натрій-фосфатний буфер, 55 мМ, NaCl, 20 мМ, рН 6,8;

концентрація: 3,9 мг/мл.

У кожному аналізі складу концентрацію лідерного антитіла коректували наприкінці UF/DF у воді або кінцевому буфері, а потім додатково розводили відповідними кількостями концентрованого буфера та розчинів добавок з отриманням бажаного кінцевого складу (деталі див. у таблиці 1).

Таблиця 1

# деталі коректування складів

№ аналізу	Початкова концентрація <sup>a</sup>	Початковий буфер <sup>a</sup>	Кінцева концентрація <sup>b</sup>
P5-7	2 мг/мл	Вода	1 мг/мл
P12	95 мг/мл	Вода	85 мг/мл
P13	112 мг/мл	Вода	100 мг/мл
P14-16	27 мг/мл	Вода	20 мг/мл
P15	125 мг/мл	Вода	100 мг/мл
17	46 мг/мл	Вода	38 мг/мл
P18	46 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	38 мг/мл
P20	42 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	35 мг/мл
P21	42 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	35 мг/мл

<sup>a</sup> Концентрація та буфер після UF/DF і коректування.

<sup>b</sup> Концентрація після розведення концентрованим буфером і розчинами добавок.

Кожний склад стерилізували шляхом фільтрації (Millex® GV, Millipore, 0,22 мкм, PVDF) у ламінарному потоці та фракцію розподіляли в скляні флакони 1 типу, що відповідали кожному моменту часу дослідження стабільності, крім дослідження із заморожуванням/розморожуванням, для якого використовували поліпропіленові пробірки.

У прикладах 2-6 визначали умови механічного впливу та термічного впливу для складів.

Для того, щоб оцінити вплив впливу струшування на зразки складів для аналізу № P5-7, флакони струшували при 350 об./хв. протягом 2-15 год. при кімнатній температурі за допомогою Rota Test 74401, а потім аналізували.

Для того, щоб оцінити вплив стресу від проходження через голку на зразки складів для аналізу № P12, 13, 16-18 і 20, можливий вплив проходження через голку (тобто напруги зрушення в голці) оцінювали за допомогою шприців для HPLC (Unimetrics Corporation, 100 мкл), якщо були доступні зразки малого об'єму, і за допомогою шприців Terumo, 26G x ½ - 0,45 x 12 мМ, якщо були доступні зразки більшого об'єму.

Для того, щоб оцінити вплив термічного впливу на зразки складів для аналізу № P5-7 і 13, флакони зберігали при 45 °C протягом 1 і 2 тижнів, а потім аналізували. Необхідну температуру для термічного впливу визначали за допомогою DSC. Зразки для аналізів № P5-7 і 13 також зберігали при 5 °C протягом 2 тижнів, а потім аналізували.

Для того, щоб оцінити вплив термічного впливу на зразки складів для аналізу № P12, 15 і 21, флакони зберігали при 5 °C протягом 3-6 тижнів і аналізували щотижня. Розчини перед ліофілізацією, називані складена лікарська речовина (FDS), для аналізів № P16-18 і 20 зберігали при 5 °C протягом 4-5 тижнів і аналізували щотижня. Розведені після ліофілізації розчини для аналізів № P14, 16-18 і 20 зберігали при 5 °C протягом 24 год., а потім аналізували.

Приклад 1 – Оптимізація рН

Першою стадією в процесі розробки складу було визначення оптимального рН для лідерного складу на основі антитіла. Для того, щоб визначити оптимальний рН, використовували низьку концентрацію лідерного антитіла (1 мг/мл в порівнянні зі 100 мг/мл), оскільки ця низька концентрація лідерного антитіла була достатньою для визначення оптимального рН. В таблиці 2 показані склади, що тестували в даному дослідженні.

Таблиця 2

аналіз № Р5 - підбирання рН

Склад № Р5-х	Буферна система	рН	Концентрація
1	Цитрат, 100 мМ	4,5	1 мг/мл
2	Цитрат, 100 мМ	5,0	1 мг/мл
3	Цитрат, 100 мМ	5,5	1 мг/мл
4	Цитрат, 100 мМ	6,0	1 мг/мл
5	Фосфат, 100 мМ	6,5	1 мг/мл
6	Фосфат, 100 мМ	7,0	1 мг/мл
7	Фосфат, 100 мМ	7,5	1 мг/мл
8	Tris, 100 мМ	8,0	1 мг/мл
9	Tris, 100 мМ	8,5	1 мг/мл

У даному дослідженні склад 1 не був стабільним, оскільки він приводив до конформаційної нестабільності лідерного антитіла. Більш конкретно, у лідерного антитіла спостерігалася тенденція розгортатися. Крім того, склад 9 приводив до дезамідування. Таким чином, було визначено, що оптимальний рН для лідерного складу на основі антитіла буде знаходитися у вузькому діапазоні близько значення рН 7,0.

Наступні дослідження інших параметрів складу, таких як буфери, поверхнево-активні речовини та стабілізатори, включали більш високі концентрації лідерного антитіла. Ці наступні дослідження, коли використовували високі концентрації лідерного антитіла, підтвердили вищевказані висновки відносно оптимального рН для лідерного складу на основі антитіла.

Приклад 2 – Буферна система/іонна сила (сіль)

Буфери

Наступною стадією в процесі розробки складу було визначення оптимального буфера для лідерного складу на основі антитіла. Тестували кілька різних буферів, таких як гістидиновий, фосфатний, Tris та їх комбінації, у декількох різних аналізах.

Таблиця 3

аналіз № Р6 - підбирання буферної системи при 1 мг/мл

Склад № Р6-х	Буферна система	рН	Концентрація
1	Гістидин 10, мМ	6,5	1 мг/мл
2	Фосфат, 10 мМ	6,5	1 мг/мл
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл
4	Фосфат, 10 мМ	7,5	1 мг/мл
5	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл
6	Tris, 10 мМ	7,5	1 мг/мл
7	Фосфат, 60 мМ	7,0	1 мг/мл

Таблиця 4

аналіз № Р7 - підбирання солі при 1 мг/мл

Склад № Р7-х	Буферна система	рН	Концентрація	Добавка
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 70 мМ
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 140 мМ
3	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 70 мМ
4	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 140 мМ

Таблиця 5

аналіз № P13 - підбирання буфера/солі при 100 мг/мл

Склад № P13-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	-
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	NaCl, 70 мМ
3	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	-
4	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	NaCl, 70 мМ

Таблиця 6

склад буферних систем

Буферна система (кислота/основа)	pH	Концентрація кислоти	Концентрація основи
Лимонна кислота/NaOH	4,5	100 мМ	Sq для pH 5,0
Лимонна кислота/NaOH	5,0	100 мМ	Sq для pH 5,0
Лимонна кислота/NaOH	5,5	100 мМ	Sq для pH 5,5
Лимонна кислота/NaOH	6,0	100 мМ	Sq для pH 6,0
Дигідрофосфат натрію/NaOH	6,5	100 мМ	Sq для pH 6,5
Дигідрофосфат натрію/NaOH	6,5	10 мМ	Sq для pH 6,5
Дигідрофосфат натрію/NaOH	7,0	100 мМ	Sq для pH 7,0
Дигідрофосфат натрію/NaOH	7,0	60 мМ	Sq для pH 7,0
Дигідрофосфат натрію/NaOH	7,0	10 мМ	Sq для pH 7,0
Дигідрофосфат натрію/NaOH	7,5	100 мМ	Sq для pH 7,5
Дигідрофосфат натрію/NaOH	7,5	10 мМ	Sq для pH 7,5
Фосфорна кислота/Tris-амінометан	8,0	Sq для pH 8,0	100 мМ
Фосфорна кислота/Tris-амінометан	8,5	Sq для pH 8,5	100 мМ
Фосфорна кислота/Tris-амінометан	7,0	Sq для pH 7,0	10 мМ
Фосфорна кислота/Tris-амінометан	7,5	Sq для pH 7,5	10 мМ
HCl/L-гістидин	6,5	Sq для pH 6,5	10 мМ
Дигідрофосфат натрію/Tris-амінометан	7,0	6,3 мМ	3,7 мМ
Дигідрофосфат натрію/Tris-амінометан	7,0	2,22 мМ	1,28 мМ

При обробці та складанні складів фільтровані зразки складів для аналізу і контролю не містили видимі та не видимі неозброєним оком частинок, та аналіз SEC продемонстрував чистоту  $\leq 92,0\%$  у зв'язку з тим, що початкова DS містила 5,5 % HMW.

Температури початку та денатурації, отримані за допомогою DSC, вказували на кращу термостабільність у наступних буферних систем для регулювання pH:

- фосфатної з pH 6,5 та 7,0: № P5-5, P5-6, P6-2, P6-3;
- Tris з pH 7,0 і 7,5: № P6-5, P6-6;

для яких температура початку становила приблизно 61 °C у порівнянні, наприклад, з 48 °C для pH 4,5 і 59 °C для гістидинового буфера.

Значення колоїдної стабільності, отримані за допомогою SLS, вказували на кращу стабільність у наступних буферних систем для регулювання pH:

- фосфатної з pH 7,5: № P6-4
- Tris з pH 7,0 і 7,5: № P6-5, P6-6;

для яких другий віріальний коефіцієнт становив близько  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> у порівнянні, наприклад, зі значеннями  $0,4 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> для гістидинового буфера та  $1,5 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> для фосфатного буфера з pH 7,0.

Різні рівні забруднення частинками спостерігали через 1 год. 30 хв. впливу струшування (див. фігуру 3).

Відносно видимих частинок кандидатними буферними системами для регулювання pH, що демонстрували високу стабільність в аналізі № P5, були наступні:

- фосфатна з pH 6,5, 7,0 та 7,5: № P5-5, P5-6 та P5-7;
- Tris з pH 8,0 і 8,5: № P5-8 та P5-9.

Аналіз № 6 виконували для цих двох буферних систем зі значеннями pH від 6,5 до 7,5. Кандидатами, що демонстрували найкращу стабільність, були наступні:

- фосфатна з pH 7,0 і 7,5: № P6-3 та P6-4;

- Tris з pH 7,0 і 7,5: № P6-5 та P6-6.

Основні значення pH, очевидно, краще підходять для мінімізації утворення частинок.

Вплив струшування і термічний вплив (2 тижні при 45 °C) є значимими способами для встановлення відмінностей між буферними системами для регулювання pH у відношенні не

5 видимих неозброєним оком частинок.

Кандидатними буферними системами для регулювання pH, що забезпечували високу стабільність, були наступні:

аналіз № 5: склади від № P5-6 до P5-9, тобто, pH  $\geq$  7,0;

аналіз № 6 (див. фігуру 4 та фігуру 5):

10 - фосфатна, 7,5: № P6-4;

- Tris, 7,5: № P6-6;

за ними ішли наступні:

- фосфатна з pH 7,0: № P6-3;

- Tris з pH 7,0: № P6-5.

15 Слід зазначити, що гістидиновий буфер (№ P6-1) продемонстрував важливий дестабілізуючий ефект за всіх умов впливу.

Виміри H1AC підтверджували дані візуального огляду: основні значення pH краще підходили для мінімізації утворення частинок. Крім того, при однаковому pH у складах на основі фосфату спостерігалось трохи менше не видимих неозброєним оком частинок, ніж в Tris-буферній системі.

20 Відносно аналізу № 5 і 6 термічний вплив демонстрував цікаві результати як у відношенні HMW. Слід зазначити, що склад № P5-1 (pH 4,5) піддавався повному розпаду через 1 тиждень при 45 °C також, як і склад № P5-2 через 2 тижні при 45 °C. Ці два зразки виключали з наступного аналізу.

25 У відношенні HMW результати через 2 тижні при 45 °C були аналогічними для складів від № P5-6 до P5-9 (pH  $\geq$  7,0) та кращими для № від P5-5 до P5-3 протягом зниження pH від 6,5 до 5,5. Для аналізу № 6 підтверджувалася дана тенденція, і кандидатними буферними системами для регулювання pH, що забезпечували високу стабільність, були наступні (див. фігуру 6):

- фосфатна з pH 6,5: № P6-2.

- Tris з pH 7,0: № P6-5;

- гістидинова з pH 6,5: № P6-5.

Таким чином, pH 6,5 забезпечував кращу стабільність відносно мінімізації утворення HMW, ніж pH 7,0, який сам по собі був краще, ніж pH 7,5. Крім того, при тому самому pH (7,0 і 7,5) склади на основі Tris забезпечували трохи менше HMW, ніж фосфатна буферна система.

35 У відношенні LMW склади № P5-3-P5-5 (pH  $\leq$  6,5) демонстрували високу стабільність через 2 тижні при 45 °C. Утворення стійких смужок LMW і додаткових смужок на гелі SDS-PAGE спостерігалось в складах № P5-6-P5-9 (7,0  $\leq$  pH  $\leq$  8,5). Розпад LMW був більш вираженим у складів № P5-9 (Tris з pH 8,5) (див. фігуру 7), і додаткові смужки на гелі SDS-PAGE були особливо видні в № P5-7 (фосфат з pH 7,5) (див. фігуру 8). Слід зазначити, що продукти розпаду, очевидно, були різними у фосфатної та Tris-буферних систем.

40 Аналіз № 6 підтвердив ці висновки та показав, що при тому самому pH склади на основі фосфатного буфера забезпечували трохи більше LMW, ніж Tris-буферні системи.

У відношенні HMW і LMW кислотні значення pH, очевидно, забезпечували кращу стабільність, ніж основні, при цьому в Tris була невелика перевага в порівнянні з фосфатною буферною системою.

45 Термічний вплив при 45 °C протягом 4 тижнів був значущим способом прискорення хімічного розпаду лідерного антитіла (тобто зміни характеру кислотності), що підтверджувалось IEF, і таким чином, вибору буферних систем для регулювання pH, що забезпечували високу стабільність лідерного антитіла (див. фігуру 9). Найменш стабільними складами були склади з Tris-буфером з pH 8,5 (№ P5-9) і з фосфатним буфером з pH 7,5 (№ P6-4), оскільки в кожному з них були представлені 2 додаткові кислотні форми в ізоформному складі, і основна форма ставала другорядною. Кандидатною буферною системою для регулювання pH, що демонструвала високу стабільність, була Tris з pH 7,0 (№ P6-5).

55 У підсумку, на підставі аналізу вихідного стану та результатів програми впливу відносно зразків для аналізу № P5 і 6 (розчинів з концентрацією 1 мг/мл) був встановлений pH 7,0. Даний вибір являє собою компроміс між високою стабільністю у відношенні видимих і не видимих неозброєним оком частинок (основними значеннями pH) і стабільністю у відношенні HMW і LMW (кислотними значеннями pH). Відносно буферних систем і фосфатна, і Tris демонстрували переваги при обраному pH: фосфатна - у відношенні видимих/не видимих неозброєним оком

60 частинок, а Tris - у відношенні HMW і LMW.

Слід зазначити, що для першого оцінювання добавок використовували фосфатну буферну систему при 10 мМ або Tris-буферну систему при 10 мМ:

- для підтвердження наведених вище результатів відносно розчинів лідерного антитіла з концентрацією 100 мг/мл,

5      • і для тестування процесу сублімаційного сушіння по відношенню до обох буферних систем окремо.

Наведені вище результати були підтверджені, і обидві буферні системи (№ P14-3 і P14-8) продемонстрували високі результати в ході процесу сублімаційного сушіння (див. фігуру 19).

10      При pH 7,0 фосфатний буфер мав більшу буферну ємність, ніж Tris; однак на відміну від Tris, його основа мала тенденцію осаджуватися під час стадій заморожування. Для об'єднання переваг Tris і фосфатного буфера була обрана суміш цих двох буферних систем: фосфат, 6,3 мМ і Tris, 3,7 мМ. Незважаючи на те, що застосування Tris-буфера або фосфатного буфера відомо з рівня техніки (застосування кожного окремо), комбінування Tris-буфера та фосфатного буфера в буферній системі вкрай нетипово та не відомо з рівня техніки.

15      Провідність (вибір pH і буфера)

Розчин перед ліофілізацією мав провідність приблизно 300 мкСм/см, що теоретично давало провідність DP після розведення, рівну 850 мкСм/см.

20      Спершу пробували буфер, що широко використовується для mAb - гістидиновий, у його забуферюючому діапазоні при pH 6,2 і 6,6 і при концентрації 10 мМ. При pH 6,2 виникла проблема нерозчинності, пов'язана з осадженням лідерного антитіла при кімнатній температурі (див. фіг. 29). При pH 6,6 розчин незначно опалесцював при кімнатній температурі, другий віріальний коефіцієнт був низьким -  $0,4 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>. На відміну від більшості mAb, для лідерного антитіла гістидиновий буфер не був прийнятним.

25      Потім пробували інший буфер, що широко використовують, фосфатний, у його забуферюючому діапазоні при pH 6,5, 7,0 і 7,5 та при концентрації 10 мМ. Для pH 6,5 і 7,0 другий віріальний коефіцієнт був нижче  $1,5 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>, що означало низьку колоїдну стабільність. Для pH 7,5 другий віріальний коефіцієнт становив близько  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>, що означало високу колоїдну стабільність, однак при термічному впливі (2 тижня при 45 °C) спостерігалось більш істотне зниження чистоти (збільшення кількості і HMW, і LMW), ніж при pH 6,5 і 7,0. Фосфатний буфер є гарним буфером, однак при кислотному pH низька колоїдна стабільність, а при основному pH лідерне антитіло чутливе до термічного впливу.

30      Для того, щоб розширити зону підбирання буфера, Tris тестували в його забуферюючому діапазоні при pH 7,0 і 7,5 та при концентрації 10 мМ. Обидва значення pH забезпечували високу колоїдну стабільність, при цьому віріальний коефіцієнт становив близько  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>. При термічному впливі (2 тижні при 45 °C) при pH 7,5 спостерігалось більш істотне зниження чистоти (збільшення кількості і HMW, і LMW), ніж при pH 7,0. Однак Tris-буфер при pH 7,0 забезпечував багато кращу стабільність по відношенню HMW і трохи кращу стабільність по відношенню LMW, ніж фосфатний буфер при такому ж pH. Tris з pH 7,0 є кращою буферною системою, ніж Tris з pH 7,5 і фосфатна з pH 7,0. Однак для досягнення високої буферної місткості Tris при даному pH (pKa=8,1) необхідна кількість буде більше максимальної, що використовується в продукті, який серійно випускається.

40      Для того, щоб оптимізувати буфер для лідерного антитіла, вибирали комбінацію фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ для досягнення високої буферної місткості при pH 7,0 за рахунок фосфату (pKa=7,2) і високої стабілізації лідерного антитіла за рахунок Tris.

45      Як зазначено вище, незважаючи на те, що застосування Tris-буфера або фосфатного буфера відомо з рівня техніки (застосування кожного окремо), комбінування Tris-буфера та фосфатного буфера в буферній системі вкрай нетипово і не відомо з рівня техніки.

Іонна сила/концентрація солі

50      Хлорид натрію (NaCl) тестували з двома обраними кандидатними буферами для регулювання pH при концентрації 70 мМ відносно розчинів лідерного антитіла з концентрацією 100 мг/мл.

Температури початку і денатурації, отримані за допомогою DSC, а також значення колоїдної стабільності, отримане за допомогою SLS, не вказували на будь-який значний ефект NaCl відносно стабільності розчинів.

55      Після механічного впливу на зразки складів для аналізу № P13 і двох тижнів зберігання при 5 °C того ж складу кандидати № P13-1 і P13-3, тобто без NaCl, демонстрували кращу стабільність відносно утворення HMW (див. фігуру 10). Те ж, але обернене на фігурі 33.

60      Збільшення концентрації солі викликало збільшення іонної сили, що викликало збільшення кінетичних показників агрегації лідерного антитіла. Таким чином визначили, що склад не повинен містити сіль або осмотичний засіб. Крім цього, визначили, що оптимальний склад

повинен містити низьку концентрацію буфера для того, щоб іонна сила була низкою.

Приклад 3 –Поверхнево-активна речовина

- 5 Наступною стадією в процесі розробки складу було визначення оптимальних наповнювачів для лідерного складу на основі антитіла. Наповнювачі повинні бути достатніми, щоб стабілізувати лідерне антитіло та підходити для ліофілізації. Тестували кілька різних поверхнево-активних речовин, таких як полісорбати та полоксамери, у різних концентраціях.

Таблиця 7

аналіз № P12- підбирання добавок при 85 мг/мл

Склад № P12-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Гліцин, 1 % (вага/об'єм) (130 мМ)
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 5 % (вага/об'єм)
5	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-
6	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	-
7	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS20, 0,01 % (вага/об'єм)	-
8	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS20, 0,1 % (вага/об'єм)	-
9	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	Полоксамер, 0,05 % (вага/об'єм)	-
10	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	Полоксамер, 0,1 % (вага/об'єм)	-
11	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	-	-

Таблиця 8

аналіз № P23- підбирання добавок при 100 мг/мл

Склад № P23-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,2 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,3 % (вага/об'єм)

- 10 Безпосередньо після відфільтрування частинок розміром 0,22 мкм зразки складів для аналізу та контролі не містили видимі та не видимі неозброєним оком частинки. Аналіз SEC показав чистоту  $\leq 92,0$  %, обумовлену концентрацією лідерного антитіла, що становила від 4,5 мг/мл до 100 мг/мл (вихідна DS містила 3,0 % HMW).

- 15 Механічний вплив був значущим способом встановлення відмінностей між кандидатними складами. У зв'язку з тим, що була доступна обмежена кількість вихідного матеріалу, стандартне візуальне спостереження було неможливе та, внаслідок цього, застосовували спостереження в капілярі під збільшувальним склом. У відношенні видимих/не видимих неозброєним оком частинок, кандидатами, що демонстрували гарну стабільність в аналізі № 12, були наступні (див. фігуру 11):

- 20 • PS80, 0,1 %: № P12-6;  
• PS20, 0,1 %: № P12-8.

- Серед поверхнево-активних речовин, що тестували, жодна не впливала на утворення HMW в порівнянні зі складом без поверхнево-активної речовини, крім № P12-8 (0,1 % PS20), яка спричиняла невеликий негативний ефект протягом шести тижнів зберігання при 5 °C (див. фігуру 12).

- 25 На завершення, між поверхнево-активними речовинами не було сильної відмінності.

Наступна поверхнево-активна речовина: PS80 вибирали для запобігання утворення видимих/не видимих неозброєним оком частинок.

Далі тестували різні концентрації PS80 у лідерному складі на основі антитіла (див. таблицю 23). Концентрації PS80 від 0,05 до 0,2 % тестували відносно впливу струшування протягом 15 годин при 350 об./хв. (кімнатна температура). Зразки аналізували за допомогою мікроскопії в проточній комірці, а результати показано в таблиці 9. В таблиці 9 показано, що концентрація PS80 від 0,05 до 0,2 % спричиняла еквівалентний стабілізуючий ефект відносно впливу струшування при всіх концентраціях. Таким чином, у складі можна використовувати концентрацію PS80 від 0,05 до 0,2 %.

Таблиця 9

концентрація PS80

15 год. при 350 об./хв. при кімнатній температурі

	≥ 2 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
F2 (0,05 % PS80)	2589	148	21
F3 (0,07 % PS80)	975	32	2
F4 (0,1 % PS80)	698	58	3
F5 (0,2 % PS80)	1969	98	16

FCM: кількість частинок в мл

#### Приклад 4 – Цукроза

Як зазначено вище, наступною стадією в процесі розробки складу було визначення оптимальних наповнювачів для лідерного складу на основі антитіла. Наповнювачі повинні бути достатніми, щоб стабілізувати лідерне антитіло та підходити для ліофілізації. Тестували кілька різних цукрів, таких як цукроза, трегалоза та маніт, у різних концентраціях.

Таблиця 10

аналіз № P14- підбирання добавок для ліофілізату

Склад № P14-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	-	-
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	-
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	NaCl, 70 мМ	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
5	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	NaCl, 70 мМ	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
6	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Гліцин, 1 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
7	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,3 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
8	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)

Таблиця 11

аналіз № Р15- підбирання добавок при 100 мг/мл – DoE

Склад № Р15-х	Буферна система	pH	Конц.	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3	Добавка 4
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	-	Пролін, 5,8 % (вага/об'єм)
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	-	Пролін, 5,8 % (вага/об'єм)
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 10 % (вага/об'єм)	-	-
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-	Етанол, 2 % (вага/об'єм)	Глутамінова кислота, 7,3 % (вага/об'єм)
5	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-	PEG 400, 1 % (вага/об'єм)	Аспартат, 8,7 % (вага/об'єм)
6	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 10 % (вага/об'єм)	-	Аспартат, 8,7 % (вага/об'єм)
7	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	Гліцерин, 5 % (вага/об'єм)	Гліцин, 1,9 % (вага/об'єм)
8	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	PEG 400, 1 % (вага/об'єм)	-
9	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 10 % (вага/об'єм)	PEG 400, 1 % (вага/об'єм)	Пролін, 5,8 % (вага/об'єм)
10	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	-	Аспартат, 8,7 % (вага/об'єм)
11	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	Етанол, 2 % (вага/об'єм)	-
12	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-	Гліцерин, 5 % (вага/об'єм)	-
13	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 10 % (вага/об'єм)	Гліцерин, 5 % (вага/об'єм)	Глутамінова кислота, 7,3 % (вага/об'єм)
14	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-	-	Гліцин, 1,9 % (вага/об'єм)
15	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	-	Глутамінова кислота, 7,3 % (вага/об'єм)
16	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	Етанол, 2 % (вага/об'єм)	Гліцин, 1,9 % (вага/об'єм)

Таблиця 12

аналіз № Р16- підбирання добавок та розробка способу для ліофілізату

Склад № Р16-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3	Добавка 4
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	-
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Трегалоза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	-
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,05 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	-



Таблиця 12

аналіз № Р16- підбирання добавок та розробка способу для ліофілізату

Склад № Р16-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3	Добавка 4
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)	PEG 4000, 1 % (вага/об'єм)

Таблиця 13

аналіз № Р17-FDS - підбирання добавок при 38 мг/мл

Склад № Р17-х-FDS	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033 % (вага/об'єм)	Цукроза, 3,33 % (вага/об'єм)	-
2	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,67 % (вага/об'єм)	Маніт, 1 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033 % (вага/об'єм)	-	Гліцин, 0,37 % (вага/об'єм)

Таблиця 14

аналіз № Р17- підбирання добавок та розробка способу для ліофілізату

Склад № Р17-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 10 % (вага/об'єм)	-
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	-	Гліцин, 2,2 % (вага/об'єм)

На завершення, на підставі наведених вище досліджень як наповнювач вибирали цукрозу, оскільки вона стабілізувала лідерне антитіло. Крім цього, добре відомо, що цукроза є ліопротектором, тому вона покращить ліофілізований склад. Фактично, ліофілізація без цукрози приводила до збільшення кількості HMW (див. фіг. 19). Як було виявлено згодом, 5 % цукроза є оптимальною для складу.

Приклад 5 – Стабілізатори

Як зазначено вище, наступною стадією в процесі розробки складу було визначення оптимальних наповнювачів для лідерного складу на основі антитіла. Наповнювачі повинні бути достатніми, щоб стабілізувати лідерне антитіло та підходити для ліофілізації. Тестували кілька різних стабілізаторів, таких як маніт, аспартат, пролін, гліцин, аргінін і лейцин, у різних концентраціях. Це можна побачити в таблицях, наведених нижче, і в таблицях 10-14, наведених вище.

Таблиця 15

аналіз № Р18- підбирання добавок та розробка способу для ліофілізату

Склад № Р18-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Аспартат, 4,3 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Пролін, 5,8 % (вага/об'єм)

Таблиця 16

аналіз № P20-FDS - підбирання добавок при 35 мг/мл

Склад № P20-х-FDS	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,75 % (вага/об'єм)	Маніт, 1,05 % (вага/об'єм)
2	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,75 % (вага/об'єм)	Аспартат, 1,05 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,75 % (вага/об'єм)	Пролін, 1,05 % (вага/об'єм)
4	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,75 % (вага/об'єм)	Гліцин, 1,05 % (вага/об'єм)
5	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1,75 % (вага/об'єм)	Аргінін, 1,05 % (вага/об'єм)

Таблиця 17

аналіз № P20 - підбирання добавок та розробка способу для ліофілізату

Склад № P20-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Аспартат, 3 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Пролін, 3 % (вага/об'єм)
4	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Гліцин, 3 % (вага/об'єм)
5	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1 % (вага/об'єм)	Цукроза, 5 % (вага/об'єм)	Аргінін, 3 % (вага/об'єм)

Таблиця 18

аналіз № P21- підбирання добавок при 35 мг/мл

Склад № P21-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавки 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
2	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	Сульфобутиловий етер β-циклодекстрину, 3 % (вага/об'єм)
3	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	N-ацетил-цистеїн, 3 % (вага/об'єм)
4	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	Лейцин, 0,3 % (вага/об'єм)
5	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	L-лізину монохлоргідрат, 3 % (вага/об'єм)
6	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	N-ацетил-цистеїн, 0,03 % (вага/об'єм)
7 <sup>c</sup>	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	Цукроза, 1 % (вага/об'єм)	Маніт, 3 % (вага/об'єм)
8	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01 % (вага/об'єм)	-	-

Таблиця 18

аналіз № P21- підбирання добавок при 35 мг/мл

Склад № P21-х	Буферна система	pH	Концентрація	Добавки 1	Добавка 2	Добавка 3
---------------	-----------------	----	--------------	-----------	-----------	-----------

с Такий же склад, як і № P21-1, але даному зразку додали інертність за допомогою азоту при зберіганні при 5 °C

Метою цих підбирань було знайти добавку для додаткової стабілізації лідерного антитіла відносно утворення HMW (аналіз № 12, 15, 20-FDS і 21). У зв'язку з високою схильністю лідерного антитіла до агрегації передбачувана температура тривалого зберігання (тобто 5 °C), як було виявлено, є значимою для відстеження ефекту добавок.

План експерименту (DoE) - модель підбирання, перша ступінь, матриця D-оптимального плану - був створений для спостереження ефекту різних цукрів, поліолів, амінокислот та розчинників відносно утворення HMW (аналіз № 15). Підсумок даного DoE наведено в таблиці 19.

Таблиця 19

підсумок аналізу № 15 (DoE), що стосується підбирання добавок

Параметри	HMW	DSC	Висновок
Цукри та поліоли	Невелика стабілізація за допомогою маніту	Невелика стабілізація за допомогою цукрози та трегалози	Невеликий позитивний ефект цукрів та поліолів
Амінокислоти	Сильна стабілізація за допомогою аспартату та невелика стабілізація за допомогою гліцину, проліну та глутаміну	Стабілізація за допомогою аспартату та невелика за допомогою гліцину та проліну	Позитивний ефект аспартату, гліцину та проліну
Розчинники	Сильна дестабілізація за допомогою етанолу	Сильна дестабілізація за допомогою етанолу	Відсутність ефекту або дестабілізуючий ефект розчинників
Буферні системи	Ефект відсутній	ND	Відмінність між буферними системами відсутня

Добавки, які, як було виявлено, спричиняли ефект на HMW, тестували окремо в аналізі № 12 і 20-FDS:

- амінокислоти гліцин (№ P12-1 і P20-4-FDS) і пролін (№ P20-3-FDS), як було виявлено, виявляли найкращий ефект в мінімізації утворення HMW (див. фігуру 13 та фігуру 14),
- за ними ішов маніт (№ P20-1-FDS) (див. фігуру 14),
- за ним ішли цукроза (№ P12-3) і трегалоза (№ P12-4), які були набагато менш ефективними (див. фігуру 13),
- зрештою, позитивний ефект 8 % аспартату (№ P20-2-FDS) не був підтверджений при концентрації 4 % (див. фігуру 14).

У ході аналізу № 21 тестували декілька інших добавок:

- лізин (№ P21-5), як було виявлено, спричиняв невеликий позитивний ефект відносно утворення HMW (див. фігуру 15),
- маніт (№ P21-1), як було виявлено, був найкращим у цьому аналізі.

Було виявлено, що додавання проліну до складу спричиняло два ефекти: він контролював утворення HMW шляхом зниження швидкості агрегації в рідкому складі та він виступав як об'ємоутворюючий засіб для забезпечення більш гладкого осаду в ліофілізованому складі. Також було виявлено, що додавання маніту в ліофілізований склад обумовлювало гладкість осаду.

Далі тестували різні концентрації проліну в лідерному складі на основі антитіла (див. таблицю 23). Тестували концентрації 1 % і 3 %. Зразки аналізували за допомогою UPLC, а

- результати показано в таблицях 20 та 21 та на фігурі 16. Таблиці 20 та 21 показують, що в складі можна використовувати концентрацію проліну або 1, або 3 %. Ці дані також підтверджують позитивний ефект проліну відносно кінетичних показників, що стосуються HMW. Крім того, осад трохи більш гладкий (менш складчастий) при використанні 3 % проліну, що підтверджує роль проліну як заповнювача (результати не показані).

Таблиця 20

1 % проліну

F1 (1 % проліну)				
Стабільність, n° 2				
Час (год.)	% мономеру (M)	1/M	1/M-1/M0	% HMW
0	95,0	0,01053		4,2
3,5	92,6	0,01080	0,00027	6,6
7	90,6	0,01104	0,00051	8,7
24	82,0	0,01220	0,00167	17,4

Таблиця 21

3 % проліну

F5 (3 % проліну)				
Стабільність, n° 2				
Час (год.)	% мономеру (M)	1/M	1/M-1/M0	% HMW
0	95,3	0,01049		3,8
3,5	93,2	0,01073	0,00024	6
7	91,6	0,01092	0,00042	7,8
24	84,1	0,01189	0,00140	15,1

- На завершення, хоча утворення HMW було значно зменшене шляхом додавання наповнювачів, а саме маніту та амінокислот, таких як гліцин і пролін, сприятливий ефект при концентрації лідерного антитіла 100 мг/мл не досить сильний, щоб досягти задовільного строку зберігання. У зв'язку з цим був розроблений ліофілізований склад, а також спосіб ліофілізації.

Приклад 6 – Ліофілізовані склади

- Для способу сублімаційного сушіння від 5-5,5 мл бажаної прототипної FDS з діапазоном концентрацій лідерного антитіла 20-38 мг/мл розподіляли в 15 мл флакони (див. для прикладу таблицю 13 та таблицю 14).

Спосіб сублімаційного сушіння здійснювали в попередньо концентрованому розчині при 20-38 мг/мл у практично кінцевому складі в кількості 5-5,5 мл, розподіленому в 15 мл флакони.

- Використовували три різні типи ліофілізованих систем від Usifroid: PL45 (аналіз № 14), SMH-300 (аналіз № 17) і SMH-90 (аналіз № 16, 18, 20). Деталі циклів ліофілізації див. в таблиці 22. Нахил кривої зміни температури між стадіями ліофілізації становив 1 °C/хв.

Таблиця 22

цикли ліофілізації, використані для кожного аналізу

№ аналізу	Температура заморожування T <sub>заморожування</sub>	Тривалість при T <sub>заморожування</sub>	Температура первинного сушіння	Тривалість стадії первинного сушіння <sup>a</sup>	Температура вторинного сушіння	Тривалість стадії вторинного сушіння	Час утримання при 20°C <sup>b</sup>
14	-45 °C	100 хв.	-10 °C	20 год.	30 °C	7 год.	14 год.
16	-42 °C	60 хв.	-25 °C	46 год.	30 °C	18 год.	18 год.
17	-45 °C	60 хв.	-25 °C	51 год.	30 °C	21 год.	20 год.
18	-42 °C	60 хв.	-25 °C	37 год.	30 °C	18 год.	18 год.
20	-42 °C	60 хв.	-25 °C	53 год.	40 °C	18 год.	3 год.

цикли ліофілізації, використані для кожного аналізу

№ аналізу	Температура заморожування $T_{\text{заморожування}}$	Тривалість при $T_{\text{заморожування}}$	Температура первинного сушіння	Тривалість стадії первинного сушіння <sup>a</sup>	Температура вторинного сушіння	Тривалість стадії вторинного сушіння	Час утримання при 20°C <sup>b</sup>
-----------	---	--	--------------------------------	---	--------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------

a Установлена під час експерименту відповідно до виміру температури продукту

b Цикл закінчувався тільки під час стандартних годин часу роботи

Отриману висушену речовину потім розбавляли при цільовій концентрації 100 мг/мл шляхом додавання відповідної кількості WFI (від 1,0 до 1,6 мл).

5 Для аналізів з ліофілізацією № P16-20 1 мл розчинів FDS заморожували при -20 °C, один раз заморожували при кімнатній температурі, а потім аналізували.

Також проводили тестування із заморожуванням і розморожуванням проміжної DS (кінець стадії HAP – BD) (аналіз № 9). Для даного аналізу 20 мл DS в 50 мл пляшках Nalgene з HDPE заморожували і при -20 °C, і при -70 °C, розморожували при кімнатній температурі один раз, а потім аналізували.

10 Застосовували наступні аналітичні методи:

- візуальний огляд зовнішнього вигляду (прозорість та колір);
- поглинання світла (HIAC) для кількісної оцінки не видимих неозброєним оком частинок;
- SEC для визначення чистоти білка;
- SDS-PAGE для визначення чистоти білка;
- 15 • IEF для визначення неоднорідності заряду;
- FCM для кількісної оцінки не видимих неозброєним оком частинок;
- DLS для визначення агрегації;
- DSC для визначення температури денатурації;
- SLS для визначення колоїдної стабільності;

20 • FT-IR-спектроскопія для визначення вторинної структури;

• флуоресцентна спектроскопія для визначення третинної структури;

• титрування за Карлом Фішером для визначення відсоткової частки залишкової води (для ліофілізату);

• XRPD для визначення кристалічної/некристалічної матриці осаду (для ліофілізату).

25 Основними критеріями для вибору складів і способу ліофілізації були наступні.

Відслідковували наступні параметри:

- стабільність лідерного антитіла під час здійснення способу ліофілізації;
- стабільність розведеного розчину;
- стабільність FDS (розчину перед ліофілізацією);

30 • гладкість осаду;

• час розведення;

• стабільність осаду.

Цикл сублімаційного сушіння вибирали, щоб уникнути колапсу осаду (див. таблицю 22):

35 • температуру заморожування встановлювали нижче температури повного отвердіння, тобто трохи нижче температури склування ( $T_g$ ), яку вимірювали за допомогою DSC для кожної кандидатної FDS (розчину перед ліофілізацією) (див. фігуру 17).

• Температуру первинного сушіння встановлювали таким чином, що температура зразка залишалася нижче температури колапсу, яка близька  $T_g$  (див. фігуру 17).

40 Усі осади, отримані в ході різних аналізів з ліофілізацією, були гладкими (див. фігуру 18), і час розведення становив у межах п'яти хвилин. Навіть якщо ці параметри були важливими для відстеження під час розробки, вони не були значущими для встановлення відмінностей між складами.

45 Під час стадії заморожування вибирали швидкість охолодження 1 °C/хв., щоб уникнути значних зрушень концентрації та pH лідерного антитіла. Температуру вторинного сушіння вибирали так (див. таблицю 22), щоб отримати рівень залишкової води в осаді, виміряний за допомогою титрування за Карлом Фішером, нижче 1 %.

Стабілізацію лідерного антитіла оцінювали за допомогою SEC і SDS-PAGE відносно чистоти і DLS і FCM відносно утворення частинок. Значущими критеріями для встановлення відмінностей між складами були рівень HMW до і після розведення та підрахунок не видимих

неозброєним оком частинок після розведення.

Для оцінки впливу способу ліофілізації відображали рівень HMW перед ліофілізацією та після розведення для кожного складу, а також збільшення даного рівня в процентних частках щодо рівня перед ліофілізацією (див. фігуру 19 та фігуру 20). Пунктирна лінія на кожній фігурі означає збільшення на 10 %. Кандидатами, що забезпечували гарну стабільність, були наступні:

- фосфат з 10 % цукрози: № P14-2;
- фосфат і Tris з 5 % цукрози + 3 % маніту: № P14-3 та P14-8;
- фосфат з 3 % маніту + 1 % гліцину: № P14-6;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % маніту: № P20-1
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % аспартату: № P20-2;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % проліну: № P20-3;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % гліцину: № P20-4.

Слід зазначити, що без будь-яких наповнювачів (№ P14-1) лідерне антитіло було досить нестабільним при здійсненні способу ліофілізації, оскільки, як спостерігалось, кількість HMW до ліофілізації збільшувалася на приблизно 130 % після ліофілізації. Такий результат був очікуваний, оскільки при циклі заморожування-розморожування, виконаному для DS при -20 °C і -70 °C (аналіз № 9), спостерігалася сильна дестабілізація лідерного антитіла (див. фігуру 21) – заморожування було першою стадією способу ліофілізації.

У відношенні не видимих неозброєним оком частинок порівняння за допомогою FCM розведених розчинів показало кращу стабільність у наступних кандидатів:

- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % проліну: № P20-3;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % гліцину: № P20-4.

Примітка: не визначене для аналізу № 14.

Щоб стабілізувати лідерне антитіло після розведення осаду, використовували наповнювачі, які, як було раніше виявлено, сповільнюють агрегацію (див. розділ, що стосується підбирання наповнювачів для рідкого складу). Стабілізацію лідерного антитіла після розведення оцінювали за допомогою SEC відносно чистоти і DLS і FCM відносно утворення частинок. Значущими критеріями для встановлення відмінностей між складами були наступні:

- рівень HMW через 24 год. після розведення (зберігання при 5 °C);
- кількість частинок після механічного впливу.

Відносно утворення HMW через 24 год. після розведення (зберігання при 5 °C) кандидатами, що забезпечували найкращу стабільність, були наступні (див. фігуру 22 та фігуру 23):

- фосфат з 3 % маніту + 1 % гліцину: № P14-6;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % проліну: № P20-3;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % гліцину: № P20-4;

за якими ішли наступні:

- фосфат з 10 % цукрози: № P14-2;
- фосфат і Tris з 5 % цукрози + 3 % маніту: № P14-3, P14-7 та P14-8;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % маніту: № P20-1.

Щоб оцінити стабільність ліофілізату, розведення виконували безпосередньо після виготовлення та протягом від одного місяця (аналізи № 16-20) до двох місяців (аналізи № 18-20) після нього. Кандидатні ліофілізати зберігали при 5 °C (аналіз № 16-20) і 20 °C (аналіз № 17). Стабільність осаду оцінювали за допомогою SEC відносно чистоти, за допомогою FCM відносно утворення частинок і за допомогою XRPD відносно структури осаду.

Відносно утворення HMW і видимих/не видимих неозброєним оком частинок усі склади, як було виявлено, були стабільними при зберіганні при 5 °C (див. фігуру 24 та фігуру 25). Невелике збільшення рівня HMW, що спостерігалось як в аналізах № 17, так і 20 через один місяць при 5 °C, не повторювалося в наступних аналізах (не показане). Крім того, невелике збільшення рівня HMW спостерігалось при зберіганні при 20 °C (див. фігуру 24).

Стабільність FDS, яка є важливим параметром для забезпечення якісного DP, враховували в аналізах № 16-18 і 20. Стабілізацію лідерного антитіла на цій стадії способу оцінювали за допомогою SEC відносно чистоти і DLS і FCM відносно утворення частинок. Зберігання при 5 °C, як було виявлено, було значущим для відстеження ефекту добавок відносно стабільності лідерного антитіла. Один цикл заморожування-розморожування, виконаний для FDS, також був значущим для встановлення відмінностей між складами.

Відносно стабільності лідерного антитіла при зберіганні при 5 °C результати були описані в розділі, що стосується добавок (див. фігуру 14). Найкраща стабільність була отримана в наступних:

- Tris/фосфат з 1,75 % цукрози + 1,05 % проліну: № P20-3-FDS;
- Tris/фосфат з 1,75 % цукрози + 1,05 % гліцину: № P20-4-FDS;

за якими ішли наступні:

- Tris/фосфат з 1,75 % цукрози + 1,05 % маніту: № P20-1-FDS.

Відносно стабільності лідерного антитіла після одного циклу заморожування-розморожування підрахунок частинок, виконаний за допомогою FCM, показав, що стабільними

були наступні кандидатні складі:

- Tris/фосфат з 1,67 % цукрози + 1 % маніту: № P17-2-FDS;
- Tris/фосфат з 1,75 % цукрози + 1,05 % маніту: № P20-1-FDS;
- Tris/фосфат з 1,75 % цукрози + 1,05 % проліну: № P20-3-FDS.

На завершення, з урахуванням наступних критеріїв: стабільності лідерного антитіла під час здійснення способу, виду і стабільності осаду, а також часу розведення, стабільності розведеного розчину та FDS, явно виділялися 2 кандидатні складі:

- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % маніту;
- Tris/фосфат з 5 % цукрози + 3 % проліну.

Висновки з прикладів 2-6

Під час робіт з отримання складів-кандидатів утворення видимих/не видимих неозбресним оком частинок регулювали за допомогою вибору діапазону рН ( $\geq 7,0$ ), буферної системи (Tris/фосфат) і, особливо, додавання поверхнево-активної речовини, полісорбату 80, у концентрації 0,2 %.

Однак утворення HMW все ще являло собою проблему для рідкого складу. Хоча утворення HMW було значно зменшене за допомогою вибору оптимального рН (7,0) і деяких наповнювачів (а саме цукрози, маніту та амінокислот, таких як гліцин і пролін), сприятливий ефект при 100 мг/мл не запобігав у достатній мірі утворенню HMW так, щоб можна було очікувати задовільного строку зберігання рідкого складу.

У зв'язку з цим розробляли ліофілізований склад, а також спосіб ліофілізації. Щоб запобігти агрегаціям під час здійснення способу ліофілізації, вибирали кріопротектор: цукрозу при концентрації 5 %. Стабілізуючі наповнювачі, обрані для рідкого складу, тестували за допомогою способу ліофілізації на предмет кращої стабілізації як рідини перед ліофілізацією (концентрація: 35 мг/мл), так і розведеного розчину (концентрація: 100 мг/мл). Декілька з цих наповнювачів підходили для способу ліофілізації, і з них вибирали два: маніт і пролін при концентрації 3 %. Основними критеріями для вибору були наступні: гладкість і стабільність осаду, а також стабільність FDS (розчину перед ліофілізацією) і розведеного розчину.

Два складі, наведені в значенні довгострокової стабільності відрізнялися одним наповнювачем (див. таблицю 23):

- прототип 1: пролін;
- прототип 2: маніт.

Таблиця 23

#### опис складів

Сполука	Концентрація	Функція
Лідерне антитіло	100 мг/мл	Активний інгредієнт
Tris/фосфат	10 мМ	Буфер – рН 7,0
полісорбат 80	0,2 % (p/v)	Стабілізатор для видимих/не видимих неозбресним оком частинок
Цукроза	5 % (p/v)	Кріопротектор + стабілізатор для HMW
Прототип 1: пролін, 3 %	3 % (p/v)	Стабілізатор для HMW + допоміжна речовина
Прототип 2: маніт, 3 %	3 % (p/v)	Стабілізатор для HMW + допоміжна речовина

Додаткові дослідження складів (приклади 7-8)

У прикладах 7-8 використовуються наступні скорочення:

DP: лікарський препарат

DS: лікарська речовина

FD: розробка складу

FDS: складена лікарська речовина

FIM: перше дослідження в людини

GRAS: загальноновизнаний безпечним

HDPE: поліетилен високої щільності

HMW: високомолекулярна сполука

IEF: ізоелектричне фокусування  
 IL: інтерлейкін  
 LMW: низькомолекулярна сполука  
 PC: полікарбонат  
 PES: поліетерсульфон  
 PP: поліпропілен  
 PVDF: полівінілідендифторид  
 RT: кімнатна температура  
 SC: підшкірний

10 Td1: перша температура денатурації  
 TOR: розрив холодового ланцюга  
 Короткий опис

Метою даних досліджень (приклади 7-8) було покращити стабільність FDS відносно сильної схильності до утворення HMW у лідерного антитіла в рідкому стані.

15 План дослідження був визначений на підставі більш ранніх даних, отриманих у дослідженнях складів-кандидатів (приклади 2-6), і він сфокусований на кінетичних показниках утворення HMW при кімнатній температурі в FDS при 35 мг/мл.

Всі використані буфери та наповнювачі вже використовувалися або в представлених на ринку продуктах на основі антитіл, або в інших продуктах для парентерального використання, зокрема, вони всі є GRAS (загальноновизнаними безпечними). рН варіював у діапазоні від 6,2 до 7,4.

У цілому 50 різних сполук порівнювали нарівні зі складом, описаним у таблиці 23. Основні висновки були наступними:

- значення рН приблизно 6,2 знижують розчинність лідерного антитіла: спостерігалось утворення гелю та осадження для сукцинатного та гістидинового буферів, відповідно;
- крім того, слід уникати використання гістидинового буфера при рН 6,6, оскільки розчин опалесцював і був трохи менш термостабільним;
- у діапазоні рН від 6,6 до 7,4 був відсутній явний ефект рН відносно кінетичних показників утворення HMW;
- збільшення іонної сили спричиняло дестабілізуючий ефект відносно кінетичних показників утворення HMW;
- фосфатний і цитратний були найкращими буферами з тестованих за умови, що вони були присутні в низькій концентрації, такий як 1,75 мМ;
- з усіх протестованих наповнювачів найкращий стабілізуючий ефект був отриманий для гліцину при 10 і 72 мМ і 2,4 % цукрози. Однак стабілізуючий ефект не дозволив значно сповільнити утворення HMW.

На завершення, результати з прикладів 7-8 не дозволили виявити нову комбінацію наповнювачів, яка могла б значно покращити склади, описані в таблиці 23, відносно утворення HMW. Рекомендовалося залишити наступний склад (див. таблицю 24): фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, рН, 7,0, PS80, 0,2 % (вага/об'єм), цукроза, 5 % (вага/об'єм), пролін, 3 % (вага/об'єм).

Таблиця 24

опис складу

Компонент	Концентрація
Лідерне антитіло	100 мг/мл
Фосфат	6,5 мМ
Tris	3,7 мМ
Цукроза	5 % (вага/об'єм)
Пролін	3 % (вага/об'єм)
PS80	0,2 % (вага/об'єм)

## Введення

45 Лідерне антитіло являє собою сконструйоване гуманізоване біспецифічне антитіло (BsAb), націлене на цитокіни IL-4 і IL-13. Його молекулярна вага, визначена за допомогою мас-спектрометрії, становить 198 кДа, а його I<sub>p</sub>, визначена за допомогою IEF, знаходиться в діапазоні від 5,8 до 6,2.

Основні зміни способу виготовлення DS реалізували у фазі IIb, а дослідження порівнянності заплановане між фазою I/IIa і фазою IIb вивчення якості DS і DP. Як частина змін виготовлення



DS було вирішено виконати дослідження складу з метою зменшити утворення HMW у рідкому стані. Таким чином, потенційне покращення складу можна включити в дослідження порівняльності.

5 Слід зазначити, що в той самий час спосіб виготовлення DP для фази IIb оптимізували відносно збільшення масштабу, розморожування FDS і зміни дози DP/флакон: 100 мг/7 мл флакон замість 150 мг/15 мл флакон. Дане дослідження проводили паралельно з розробкою складу.

Профіль продукту, що є в цей час цільовим, для даного дослідження (приклади 7-8) обумовлює наступні характеристики лікарського препарату:

- 10 • шлях введення: SC ін'єкція.
- форма DP: ліофілізована;
- концентрація: розчин розведений при 100 мг/мл;
- строк зберігання: 24 місяці;
- температура зберігання: 2 °C-8 °C;
- 15 • дозування: 100 мг/флакон;
- первинна ємність: 7 мл трубчастий флакон 1 типу з прозорого скла.

Лікарська речовина повинна бути складена при 35 мг/мл перед зберіганням при -20 °C в 1 л полікарбонатних пляшках. Ніякі додаткові наповнювачі або розведення не застосовували до сублимаційного сушіння.

20 Дослідження складів-кандидатів і дослідження складів для FIM дозволили зробити наступні висновки.

- Слід уникати кислотного pH < 6,0 (низька термостабільність і колоїдна стабільність) і основного pH > 7,5 (утворення LMW і зміна заряду ізоформ при термічному впливі).

25 • Кількість видимих/не видимих неозброєним оком частинок була значно зменшена за допомогою застосування полісорбату 80 при концентрації 0,2 % у комбінації з буферною системою фосфат/Tris, pH 7,0.

- Кінетичні показники утворення HMW збільшувалися разом зі збільшенням концентрації лідерного антитіла, і протестовані склади не запобігали в достатній мірі утворенню HMW при 100 мг/мл так, щоб можна було очікувати задовільного строку зберігання рідкого складу.

30 • Утворення HMW у рідкому стані направило розробку у бік ліофілізованого DP, що розбавляється до трохи менше, ніж 1/3 від початкового об'єму (до ліофілізації) з отриманням 100 мг/мл з 35 мг/мл FDS. Вибирали наступні кріопротектор та ліопротектор: цукрозу при концентрації 5 %.

35 • Склад, вибраний для фази I і IIa, був наступним: фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, pH, 7,0, PS80, 0,2 % (вага/об'єм), цукроза, 5 % (вага/об'єм), пролін, 3 % (вага/об'єм).

- Цей склад може бути оптимізований відносно утворення HMW шляхом комбінування наповнювачів, які, як було виявлено, спричиняють невеликий позитивний ефект, а саме цукрози, маніта та амінокислот, таких як гліцин і пролін.

40 Утворення HMW у рідкому стані, як було виявлено, є основним шляхом розпаду. Кінетичні показники збільшувалися разом зі збільшенням температури розчину (в 10 раз повільніше при 5 °C, ніж при RT в DP) і разом зі збільшенням концентрації лідерного антитіла:

- FDS при 35 мг/мл при RT:  $\Delta$ HMW = +1,6 % за 7 год. та +4,1 % за 24 год.
- DP при 100 мг/мл при RT:  $\Delta$ HMW = +0,6 % за 1 год. та +3,5 % за 5 год.

Цілі

45 Метою даного дослідження (приклади 7-8) було збільшити стабільність лідерного антитіла в рідкому стані відносно утворення HMW. Для того, щоб поставити кількісні цілі для даного дослідження, були запропоновані наступні значення:

- 5 год. при RT після розведення DP для визначення стабільності при застосуванні:  $\Delta$ HMW < +1 % за 5 год.,

50 • 12 год. TOR для FDS для того, щоб полегшити виготовлення DP:  $\Delta$ HMW < +1 % за 12 год.

Ці цільові значення враховують умови застосування розведеного DP при 100 мг/мл і умови способу виготовлення, коли FDS при 35 мг/мл знаходиться поза умовами низьких температур. Ці значення необхідно коректувати залежно від цільового профілю якості препарату.

План дослідження

55 Запропонованим підходом для даного дослідження (приклади 7-8) було провести підбирання комбінованих наповнювачів з широким колом складів при концентраціях лідерного антитіла 35 мг/мл.

Підбирання складів було зосереджено на стабілізуючих наповнювачах, які потенційно могли впливати на утворення HMW. Для даного дослідження було вирішено наступне.

60 • При підбиранні PS80 і цукрозу залишали в концентраціях, використаних у фазі I

складання, оскільки не було продемонстровано будь-якого негативного впливу відносно утворення HMW при цих концентраціях, і спостерігався сильний позитивний вплив відносно способу виготовлення та/або розведення.

5 • Діапазон рН звузили до діапазону від 6,2 до 7,4, оскільки в попередніх дослідженнях була показана перевага підтримки рН на значенні приблизно рН 7.

• Перевіряли 5 буферів для ін'єкцій у даному діапазоні рН, окремо або в комбінації з декількома наповнювачами: іншими буферними системами та/або добавками (амінокислотами, сахарозою (крім тих, які вже містилися в складі фази I) і головним чином солями).

Лікарська речовина

10 DS, використовувані в даному дослідженні (приклади 7-8), описано в таблиці 25.

Таблиця 25

опис DS

Номер партії, №	Тип	Дата вигот.	Виготовлювач	Склад	Концентрація	Зберігання	Для аналізів використовували
LT-10006-DS	FDS			фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ, цукроза, 1,75 %, пролін, 1,05 %, PS80, 0,07 %	33 мг/мл	-20 °C	H04-150-190
VAB-YKR1-000079	DS			цукроза, 2,1 %	42 мг/мл	-20 °C	H04-193

Лікарський препарат

15 DP, використовувані в даному дослідженні (приклади 7-8), були складені зі складом фази I/IIa (фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, рН, 7,0, PS80, 0,2 %, цукроза, 5 %, пролін, 3 %) (див. таблицю 26).

Таблиця 26

опис DP

№ ліофілізату DP	Дата вигот.	Виготовлювач	Концентрація/форма	3 FDS №
H04-016			150 мг/15 мг флакон	CER0315 и CER0375
H04-046			150 мг/15 мг флакон	CER0378, CER0382 та CER0392
C1016207			150 мг/15 мг флакон	GMP2
H04-193			100 мг/7 мл флакон	H04-193

Склад(и) компонентів

20 Склади компонентів для кожного аналізу з прикладів 7-8 наведені нижче в таблиці 27.

Таблиця 27

склад компонентів

№ аналізу складу	Буферна система	рН	Номінальний склад наповнювачів	Номінальна концентрація (мг/мл)
H04-150 A1	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 A2	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Tris, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 A3	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Гістидин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 A4	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Пролін, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25

## склад компонентів

№ аналізу складу	Буферна система	pH	Номінальний склад наповнювачів	Номінальна концентрація (мг/мл)
H04-150 A5	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 A6	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Tris, 10 мМ – гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
Попереднє тестування (P-H04-144)	Гістидин 10, мМ	6,2	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
Попереднє тестування (P-H04-148)	Гістидин 10, мМ	6,2	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 B1	Гістидин 10, мМ	6,6	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 B2	Гістидин 10, мМ	6,6	Tris, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 B3	Гістидин 10, мМ	6,6	Пролін, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 B4	Гістидин 10, мМ	6,6	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 C	-	6,8	Цукроза, 2,1 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-150 D	Фосфат, 3,33 мМ/Tris, 1,92 мМ	6,9	Цукроза, 8,42 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A1	Цитрат, 10 мМ	6,6	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A2	Цитрат, 10 мМ	6,6	Tris, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A3	Цитрат, 10 мМ	6,6	Гістидин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A4	Цитрат, 10 мМ	6,6	Пролін, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A5	Цитрат, 10 мМ	6,6	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 A6	Цитрат, 10 мМ	6,6	Tris, 10 мМ- гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B1	Фосфат, 10 мМ	6,6	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B2	Фосфат, 10 мМ	7,0	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B3	Фосфат, 10 мМ	7,0	Tris, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B4	Фосфат, 10 мМ	7,0	Гістидин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B5	Фосфат, 10 мМ	7,0	Пролін, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-163 B6	Фосфат, 10 мМ	7,0	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A1	Tris, 10 мМ	7,0	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A2	Tris, 10 мМ	7,4	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A3	Tris, 10 мМ	7,4	Сукцинат, 10 мМ, NaCl, 7,5 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A4	Tris, 10 мМ	7,0	Гістидин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A5	Tris, 10 мМ	7,4	Гістидин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 A6	Tris, 10 мМ	7,4	Гліцин, 10 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-172 B1	Фосфат, 1,75 мМ	7,0	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25

## склад компонентів

№ аналізу складу	Буферна система	pH	Номінальний склад наповнювачів	Номінальна концентрація (мг/мл)
H04-172 B2	Фосфат, 1,75 мМ	7,0	Цукроза, 4 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 A1	-	6,8	Цукроза, 4,15 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 A2	-	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 B1	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 B2	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Цукроза, 4,15 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 B3	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Бензоат натрію, 37,8 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 B4	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	NaCl, 38,5 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 B5	Фосфат, 5,25 мМ	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 C1	Цитрат, 5,25 мМ	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 C2	Цитрат, 1,75 мМ	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 C3	Цитрат, 1,75 мМ	6,8	Цукроза, 4,15 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 C4	Цитрат, 10 мМ	6,8	Гліцин, 72 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-185 D	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,8	Пролін, 91 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-187 A1	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,7	Пролін, 91 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-187 A2	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,8	Пролін, 91 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-187 A3	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	7,0	Пролін, 91 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-187 A4	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	7,2	Пролін, 91 мМ - цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-190 A1	-	6,8	Цукроза, 20,5 % - PS80, 0,07 %	20
H04-190 A2	-	6,8	Цукроза, 13,42 % - PS80, 0,07 %	36,25
H04-190 A2	-	6,8	Цукроза, 1,75 % - PS80, 0,07 %	36,25

а Кількість наповнювачів виражена в % вага/об'єм

## Спосіб виготовлення

- 5 Склади з прикладів 7-8 виготовляли з використанням концентрованого розчину лідерного антитіла, який був отриманий за допомогою UF/DF, при концентрації 42 мг/мл в 2,1 % цукрози. Цей розчин лідерного антитіла розводили концентрованими маточними розчинами наповнювачів.

## Спосіб UF/DF

- 10 Протягом здійснення способу UF/DF (прикладі 7-8) вихідний розчин білка при 35 мг/мл спочатку концентрували до 40 мг/мл, потім заміняли буфер. Після діалізації розчин білка концентрували до концентрації вище 42 мг/мл, що було цільовою кінцевою концентрацією (див. таблицю 28).

Використаний матеріал та умови здійснення способу для кожного випадку UF/DF описано в таблиці 28. Наприкінці UF/DF концентрацію лідерного антитіла коректували до 42 мг/мл в 2,1 % розчині цукрози.

Таблиця 28

параметри UF/DF при виготовленні

№ аналізів складу	Мембрана	Співвідношення: г білка/м <sup>2</sup> мембрана-ни (г/м <sup>2</sup> )	Концентрація білка під час діалізації (мг/мл)	Кількість об'ємів, що пройшли діалізацію	Заміна буфера	Концентрація білка наприкінці UF/DF (мг/мл)
H04-137	Pellicon 3®, 0,11 м <sup>2</sup>	216	40	9	Цукроза, 2,1 %	48,5

Коректування складу

- 5 Розчин лідерного антитіла після UF/DF (приклади 7-8) розводили відповідними кількостями концентрованих маточних розчинів до отримання бажаного кінцевого складу. Довідковий опис і склад концентрованих розчинів, виготовлених для даного дослідження, наведено в таблиці 29.

Таблиця 29

рецептура концентрованих маточних розчинів

№ аналізу складу	Буферна система	Номинальний склад наповнювачів	Скоректоване значення pH
P-H04-138	Сукцинат, 60 мМ	-	5,9
P-H04-139	Сукцинат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	5,9
P-H04-140	Сукцинат, 60 мМ	Гістидин 60, мМ	6,2
P-H04-141	Сукцинат, 60 мМ	Пролін, 60 мМ	5,9
P-H04-142	Сукцинат, 60 мМ	Гліцин, 60 мМ	5,9
P-H04-143	Сукцинат, 60 мМ	Tris, 60 мМ – гліцин, 60 мМ	5,9
P-H04-144	Гістидин 60, мМ	-	6,1
P-H04-145	Гістидин 60, мМ	-	6,6
P-H04-146	Гістидин 60, мМ	Tris, 60 мМ	6,4
P-H04-147	Гістидин 60, мМ	Пролін, 60 мМ	6,5
P-H04-148	Гістидин 60, мМ	Гліцин, 60 мМ	6,1
P-H04-149	Гістидин 60, мМ	Гліцин, 60 мМ	6,6
(H04-150)	Фос, 20 мМ/Tris 11,5 мМ	Сахароза, 40 %	Коректування відсутнє
P-H04-151	Цитрат, 60 мМ	-	6,4
P-H04-152	Цитрат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	6,3
P-H04-153	Цитрат, 60 мМ	Гістидин 60, мМ	6,6
P-H04-154	Цитрат, 60 мМ	Пролін, 60 мМ	6,4
P-H04-155	Цитрат, 60 мМ	Гліцин, 60 мМ	6,4
P-H04-156	Цитрат, 60 мМ	Tris, 60 мМ- гліцин, 60 мМ	6,2
P-H04-157	Фосфат, 60 мМ	-	6,4
P-H04-158	Фосфат, 60 мМ	-	7
P-H04-159	Фосфат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	6,9
P-H04-160	Фосфат, 60 мМ	Гістидин 60, мМ	7
P-H04-161	Фосфат, 60 мМ	Пролін, 60 мМ	7
P-H04-162	Фосфат, 60 мМ	Гліцин, 60 мМ	6,8
P-H04-164	Tris, 60 мМ	-	7,3
P-H04-165	Tris, 60 мМ	-	7,7
P-H04-166	Tris, 60 мМ	Сукцинат, 60 мМ, NaCl, 45 мМ	7,7
P-H04-167	Tris, 60 мМ	Гістидин 60, мМ	7,2
P-H04-168	Tris, 60 мМ	Гістидин 60, мМ	7,5
P-H04-169	Tris, 60 мМ	Гліцин, 60 мМ	7,6
P-H04-170	Фосфат, 10,5 мМ	-	7,2
P-H04-171	Фосфат, 10,5 мМ	Сахароза, 13,5 %	7,2
P-H04-173	-	Цукроза, 14,4 %	Коректування відсутнє
P-H04-174	-	Гліцин, 432 мМ	Коректування відсутнє

## рецептура концентрованих маточних розчинів

№ аналізу складу	Буферна система	Номінальний склад наповнювачів	Скоректоване значення pH
P-H04-175	Фосфат, 10,5 мМ	Гліцин, 432 мМ	6,8
P-H04-176	Фосфат, 10,5 мМ	Цукроза, 14,4 %	6,8
P-H04-177	Фосфат, 10,5 мМ	Бензоат натрію, 227 мМ	6,8
P-H04-178	Фосфат, 10,5 мМ	NaCl, 231 мМ	6,8
P-H04-179	Фосфат, 31,5 мМ	Гліцин, 432 мМ	6,8
P-H04-180	Цитрат, 31,5 мМ	Гліцин, 432 мМ	6,8
P-H04-181	Цитрат, 10,5 мМ	Гліцин, 432 мМ	6,8
P-H04-182	Цитрат, 10,5 мМ	Цукроза, 14,4 %	6,8
P-H04-183	Цитрат, 60 мМ	Гліцин, 432 мМ	6,8
P-H04-184	Фос, 13,3 мМ/Tris 7,7 мМ	Пролін, 547 мМ	7
P-H04-186	Фос, 13,3 мМ/Tris 7,7 мМ	Пролін, 547 мМ	6,5
P-H04-189 1	-	Цукроза, 37,5 %	Коректування відсутнє
P-H04-189 2	-	Цукроза, 70 %	Коректування відсутнє

а Кількість наповнювачів, виражена у %, наведена як співвідношення вага/об'єм.

Кожний склад стерилізували шляхом фільтрації (Millex® GV) у ламінарному потоці та фракцію розподіляли в 2 мл скляні флакони 1 типу відповідним чином (1-2 мл) і закупорювали для кожного моменту часу дослідження стабільності.

5

Умови впливу

Термічний вплив

Умови термічного впливу, виконаного в прикладах 7-8, відповідно до аналізів складів зазначено в таблиці 30.

Таблиця 30

## умови термічного впливу

№ аналізів складу	Температурний вплив	Час впливу
H04-150	RT <sup>a</sup> 5°C <sup>b</sup>	Дні: 1, 2 і 3 Дні: 2, 3 і 6
H04-163	RT <sup>a</sup> 5°C <sup>b</sup>	Дні: 1, 2 і 3 Дні: 2, 3 і 7
H04-172	RT <sup>a</sup> 5°C <sup>b</sup>	Дні: 1, 2, 3 і 6 Дні: 2, 3 і 6
H04-185	RT <sup>a</sup> 5°C <sup>b</sup>	Дні: 1, 2 і 3 Дні: 2, 3 і 6
H04-187	RT <sup>a</sup>	16 год., 24 год. і 40 год.
H04-190	RT <sup>a</sup>	16 год., 40 год. і 48 год.
H04-193	5°C <sup>c</sup> 25°C <sup>c</sup>	21 год., 30 год. і 46 год. 21 год., 30 год. і 46 год.

а У зв'язку з кондиціонуванням повітря в лабораторії RT варіювала від 21 °C до 29 °C.

б Виконували в стандартній не відповідній GMP камері при низьких температурах.

с Відповідна GMP камера з автоматичним регулюванням температури.

10

Опис аналітичних методів

У прикладах 7-8 застосовували наступні аналітичні методи:

- візуальний огляд зовнішнього вигляду (прозорість та колір);
- розчин в 7 мл флаконах оглядали при природному освітленні;
- HPLC-SEC для визначення чистоти білка
- 2 колонки PROSEC 300S-250 × 4,6 мМ при 35 °C;
- рухлива фаза: фосфат, 0,1 М/NaCl, 0,2 М, pH 7,0;

15

- виявлення: 280 нм;
- введення: 10 мкл (концентрація 5 мг/мл);
- потік: 0,2 мл/хв.;
- загальний час прогання: 40 хв.

5 Застосовували наступний аналітичний метод:

- UPLC-SEC для визначення чистоти білка
- колонка: 1 Acquity BEH200 SEC (150 × 4,6 мМ, dp=1,7 мкм) при 40 °С;
- рухлива фаза: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ/NaClO<sub>4</sub>, 300 мМ при pH 7,0;
- виявлення: UV при 280 нм;
- 10 - введення: 1 мкл (розчин при 5 мг/мл), стандарт 3014ЕТ;
- введення: 2 мкл (розчини при 2,0 мг/мл);
- потік: 0,3 мл/хв.;
- загальний час прогання: 8 хв.

Здійснювали відстеження за наступним аналітичним методом:

- 15 • DSC для визначення температури денатурації:
  - диференціальну сканувальну калориметрію (DSC) використовували для оцінки термостабільності антитіла в різних складах.
  - Калориметричні виміри виконували за допомогою VP-Capillary DSC від 25 °С до 100 °С зі швидкістю нагрівання 1 °С/хв.

- 20 - Крива місткості забезпечувала інформацію про температуру денатурації T<sub>d</sub> (°С) (максимум піка).

Критерії оцінки

- SEC: результати вважали порівнянними, якщо відмінність була рівною або меншою 0,5 % значення HMW.
- 25 • DSC: результати вважали порівнянними, якщо відмінність за T<sub>d1</sub> була рівною або меншою 0,4 °С.

Спосіб UPLC у порівнянні з HPLC

- Перше підбирання (аналізи № H04-150-172) виконували за допомогою способу HPLC, розробленого для фази I. Проблема відносно зсуву базової лінії, який впливав на визначення рівня HMW, виникала, коли підряд аналізували велику кількість зразків.

- Для другого підбирання (аналізи № H04-185-190) для того, щоб одержати точні дані динаміки рівня HMW, застосовували спосіб UPLC, при якому не спостерігалось будь-якого зсуву базової лінії. Той самий хроматографічний профіль стандарту спостерігався навіть після введення більше 200 зразків в ту саму колонку.

- 35 Еталонні склади для SEC-вимірів

Для того, щоб порівняти різні серії відносно динаміки рівня HMW протягом часу, склад фази I використовували як еталонний.

- Для першого підбирання (аналізи № H04-150-172) для кожної з 3 серій одержували FDS фази I шляхом розведення за допомогою WFI при 35 мг/мл ліофілізату DP № H04-016.
- 40 • Для другого підбирання (аналізи № H04-185-190) для кожної з 3 серій крім раніше зазначеної FDS фази I (H04-016) використовували іншу свіжовиготовлену FDS фази I нарівні зі складами, що тестують. Також використовували 3<sup>є</sup> еталонну FDS фази I (№ LT-10006-DS): FDS, що не піддавалася сублімаційному сушінню, а тільки розморожена.

- Несподівано виявилось, що кінетичні показники, що стосуються HMW, відрізняються в різних еталонних складах. Для порівняння, два додаткових ліофілізата DP тестували поряд з ліофілізатом DP № H04-016. Відмінність між ліофілізатами DP стала істотною через 40 год. при RT. Однак розморожений еталонний склад № LT-10006-DS значно відрізнявся від усіх ліофілізатів DP, починаючи з 16 год. при RT. В ліофілізата DP спостерігалися більш високі кінетичні показники, що стосуються HMW, ніж в розмороженого еталонного складу № LT-10006-DS, і, отже, його не можна використовувати для порівняння складів, виготовлених у даному дослідженні (склади для даного дослідження виготовляли на основі розмороженої FDS (див. розділ, що стосується способу виготовлення), зі складом фази I/IIa).

- При використанні однієї й тієї ж партії та свіжоотриманого DP, що піддавали сублімаційному сушінню, не спостерігалось значної відмінності за кінетичними показниками, що стосуються HMW, між розмороженою FDS та ліофілізатом DP. Таким чином, кінетичні показники, які стосуються HMW, що спостерігалися у свіжовиготовлених для даного дослідження складів, будуть також спостерігатися в тих же складів після сублімаційного сушіння.

- Висновок, зроблений на підставі цих аналізів, не можна поширити на всі ліофілізати DP і всі розморожені FDS. Порівняння кінетичних показників, що стосуються HMW, між різними партіями може залежати від різних параметрів і буде вимагати спеціального та окремого дослідження.

## Результати та обговорення

Усі склади, виготовлені в прикладах 7-8, містили щонайменше 1,75 % (вага/об'єм) цукрози та близько 0,07 % (вага/об'єм) PS80. Ці концентрації є номінальними значеннями та ґрунтуються на кратності розведення, застосованої до вихідного розчину лідерного антитіла.

Відносно концентрації PS80 було зроблене допущення, що поглинанням PS80 у ході UF/DF можна зневажити. Концентрації цього наповнювача були такі ж, як у складі фази I.

## Приклад 7 – Підбирання буфера

У даному прикладі підбирали pH від 6,2 до 7,4 і в межах даного діапазону тестували всі буфери для ін'єкцій: сукцинатний, гістидиновий, цитратний, фосфатний та Tris.

## А) Тип буфера та pH

У першому підбиранні (аналізи № H04-150-172) зазначені вище буфери тестували при концентрації 10 mM у комбінації з декількома наповнювачами, які будуть більш докладно описано в прикладі 8 - підбиранні добавок. Слід зазначити, що концентрація буфера була постійною при 10 mM, і що її вплив відносно утворення HMW можна буде побачити в розділі, що стосується концентрації буфера (приклад 7).

## DSC

Результати DSC показали, що всі склади були порівнянними з еталонним ( $T_d1=65,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), крім складів з гістидином, які були трохи менш термостабільними ( $T_d1=64,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $65,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (див. фігуру 26).

## Візуальний огляд у початковий момент часу

Всі склади були прозорими та порівнянними з еталонним, крім складів при pH 6,2 і складів з гістидином при pH 6,6.

При pH 6,2 зниження розчинності спостерігалось в обох буферів, що тестувалися.

- Склади з гістидином осаджувалися при RT (див. фігуру 27).

- Склади з сукцинатом трохи опалесціювали при RT, і можна було спостерігати утворення гелю при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (див. фігуру 27), цей процес був оборотним, якщо розчин знову нагрівали до RT і обережно струшували. Сукцинат міг мати хелатуючі властивості.

При pH 6,6 склади з гістидином трохи більше опалесціювали при RT, ніж еталонний зразок.

## Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Оскільки результати, представлені в даному документі, були отримані для 3 різних серій, динаміку рівня HMW не можна порівнювати прямо, а тільки з еталонним складом.

- Склад з гістидиновим буфером при pH 6,6 був порівнянним з еталонним складом при RT і трохи кращим при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (+2,4 % для гістидину окремо та +3,2 % за 144 год. для еталонного складу).

- Склад з цитратним буфером при pH 6,6 при RT був трохи кращим, ніж еталонний склад (+4,6 % для цитрату окремо та +5,2 % за 24 год. для еталонного зразка), і порівнянним з еталонним складом при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Склад з фосфатним буфером при pH 6,6 при RT був трохи кращим, ніж еталонний склад (+8,2 % для фосфату окремо та +9,0 % за 48 год. для еталонного складу), і порівнянним з еталонним складом при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Склад з фосфатним буфером при pH 7 був порівнянним з еталонним складом при RT і  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Склад з Tris-буфером при pH 7 був трохи гіршим, ніж еталонний склад при RT (+7,8 % для Tris окремо та +7,0 % за 48 год. для еталонного зразка), і порівнянним з еталонним зразком при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Склад з Tris-буфером при pH 7,4 був порівнянним з еталонним складом при RT і  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## Див. фігуру 28.

Відносно утворення HMW при pH 6,6 фосфатний і цитратний буфери були порівнянними, а при pH 7,0 фосфатний був трохи більш стабілізуючим, ніж Tris. Зазначені вище буфери при 10 mM не можна прямо порівнювати зі складом фази I/IIa, оскільки еталонним складом, використаним для даного підбирання, був ліофілізат, виготовлений з іншої партії (див. наведений вище розділ, що стосується еталонних складів для SEC-вимірів).

## Висновок

Відносно підбирання буферної системи при концентрації 10 mM можна зробити наступні висновки.

- Значення pH приблизно 6,2 (близько pI) знижували розчинність лідерного антитіла:

- утворення гелю спостерігалось для сукцинатного буфера при pH 6,2.

- Осадження спостерігалось для гістидинового буфера при pH 6,2.

- Крім того, слід уникати використання гістидинового буфера при pH 6,6, оскільки розчин



опалесціював і був трохи менш термостабільним.

- Відсутня явна тенденція ефекту рН у межах діапазону від 6,6 до 7,4 відносно утворення HMW для тестованих буферів: гістидинового, цитратного, фосфатного та Tris.

- Ефект буфера відносно утворення HMW дуже слабкий, хоча цитратний і фосфатний, як виявилось, є найкращими буферами при 10 мМ.

В) Точне регулювання рН для складу фази I/IIa

Для того, щоб визначити в цьому ж дослідженні вплив рН відносно утворення HMW, підбирали рН у діапазоні від 6,7 до 7,2 для складу фази I (аналізи № H04-187).

DSC

Результати DSC показали, що всі склади були порівнянними з еталонним (рН 7,0) (див. фігуру 29).

Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Спостерігалася невелика тенденція до зменшення утворення HMW при збільшенні рН від 6,7 до 7,2 (див. фігуру 30), однак вона ставала значною тільки через 24 год. при RT (+4,1 % для рН 6,7 і +3,4 % для рН 7,2).

Висновок

Для буфера фосфат, 2,2 мМ/Tris, 1,3 мМ (склад фази I) спостерігався невеликий ефект рН у діапазоні від 6,7 до 7,2 через 24 год. при RT. Однак цей ефект був слабким, оскільки він не був значним протягом перших 16 год. Це підтверджувало слабкий ефект рН відносно утворення HMW у цьому діапазоні рН.

С) Концентрація буфера

Цитратний і фосфатний буфери тестували при концентраціях менше 10 мМ: 0, 1,75 і 5,25 мМ, для того, щоб вивчити вплив концентрації буфера відносно утворення HMW (аналізи № H04-185). Встановлювали проміжне значення рН у тестованому діапазоні: рН=6,8. Всі склади містили гліцин при 72 мМ для коректування осмоляльності та, як було сказано на початку розділу, що стосується результатів і обговорення, 1,75 % цукрози та приблизно 0,07 % PS80.

DSC

Результати DSC показали, що всі склади були порівнянними з еталонним (складом фази I) (див. фігуру 31). Слід зазначити, що склад з гліцином при відсутності буфера (185A2) був трохи менш стабільним, ніж інші тестовані склади (Td1 відрізнялася приблизно на 1 °C).

Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Для обох тестованих буферів спостерігалася невелика тенденція до зменшення утворення HMW при збільшенні концентрацій буферів, при цьому найкращі результати одержували при відсутності буфера та при 1,75 мМ у буфері (наприклад, +7,8 % для цитратного буфера при 10 мМ і +7,0 % для відсутності буфера за 48 год. при RT) (див. фігуру 32). Склади з цитратним буфером при 1,75 мМ і за відсутності буфера були порівнянними з еталонним складом (наприклад, +7,1 % для цитратного буфера та +7,0 % для відсутності буфера за 48 год. при RT, при цьому +6,8 % для еталонного складу).

Висновок

Зменшення концентрації буфера спричиняло невеликий стабілізуючий ефект на кінетичні показники утворення HMW. Цей ефект, імовірно, був пов'язаний з іонною силою. Відсутність буфера та цитратний буфер при 1,75 мМ були найкращими кандидатами з точки зору утворення HMW, за якими безпосередньо ішов фосфат при 1,75 мМ. Буфери, тестовані з гліцином при 72 мМ, були порівнянними зі складом фази I/IIa.

Приклад 8 – Підбирання добавок

Здійснювали підбирання добавок гліцину, проліну, гістидину та Tris у комбінації з підбиранням буфера (перше підбирання: аналізи № H04-150-172) для того, щоб виявити можливі синергетичні взаємодії між наповнювачами. Підбирання добавок хлориду натрію, бензоату натрію, гліцину та цукрози (друге підбирання: аналізи № H04-185-190) виконували для фосфатного або цитратного буферів, найкращих буферів, вибраних у результаті першого підбирання (приклад 7).

Склади містили 1,75 % цукрози та приблизно 0,07 % PS80.

А) Хлорид натрію та бензоат натрію

Хлорид натрію та бензоат натрію тестували, щоб оцінити ефекти іонної сили та гідрофобних взаємодій, відповідно, відносно утворення HMW. Ці добавки тестували для фосфатного буфера при 1,75 мМ з рН 6,8 при концентрації, що не перевищувала осмоляльність складу фази I (165 мосмоль/кг в FDS).

DSC

Результати DSC показали, що склад з NaCl був порівнянним з еталонним (Td1=65,7 °C для NaCl і 65,6 °C для еталонного складу), тоді як склад з бензоатом натрію був трохи менш

термостабільним ( $T_d1=65,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Для обох тестованих добавок, спостерігався явний негативний ефект відносно утворення HMW у порівнянні з еталонним складом (наприклад, +5,2 % для NaCl при 38,5 мМ, +5,2 % для бензоату натрію при 37,8 мМ і +3,2 % для еталонного складу за 24 год. при RT). Динаміка була однаковою для обох наповнювачів, але в даному документі показані результати тільки для NaCl (див фігуру 33).

Висновок

Як видно для концентрації буфера, збільшення іонної сили за допомогою NaCl або бензоату натрію спричиняло явний негативний ефект відносно кінетичних показників утворення HMW. Крім того, ефект гідрофобних взаємодій відносно кінетичних показників HMW, обумовлений додаванням бензоату натрію, не спостерігався.

В) Гліцин, пролін, гістидин і Tris

Ці добавки (гліцин, пролін, гістидин і Tris) тестували при концентрації 10 мМ (перше підбирання: аналізи № H04-150-172).

DSC

Результати DSC показали, що всі склади із зазначеними вище добавками були порівнянними зі складом без них (тільки з буфером).

Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Відмінності між складами були слабкими, хоча тенденції можна було спостерігати через 48 год. при RT і 6 днів при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

- гістидиновий буфер:

- при RT:  $\emptyset$  (відсутність добавок) = гліцин > пролін > Tris;

- при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ :  $\emptyset$  > гліцин = пролін > Tris;

- цитратний буфер:

- при RT: гліцин > пролін = гістидин = Tris = (Tris + гліцин) >  $\emptyset$ ;

- при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ : гліцин > пролін = гістидин = Tris = (Tris + гліцин) =  $\emptyset$ ;

- фосфатний буфер:

- при RT: гліцин = пролін =  $\emptyset$  > гістидин = Tris;

- при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ : гліцин > пролін =  $\emptyset$  = гістидин = Tris;

- Tris-буфер:

- при RT: гліцин >  $\emptyset$  = гістидин;

- при  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ : гліцин =  $\emptyset$  = гістидин;

Висновок

Відносно утворення HMW ефекти цих добавок були слабкими, хоча можна було спостерігати наступні тенденції:

- гліцин при 10 мМ спричиняв невеликий позитивний ефект;

- гістидин і пролін при 10 мМ, очевидно, не спричиняли ефект;

- Tris при 10 мМ не спричиняв стабілізуючий ефект і навіть міг спричиняти невеликий дестабілізуючий ефект.

С) Цукроза та гліцин

У другому підбиранні (аналізи № H04-185) додаткова кількість цукрози, що становить 2,4 % (на додаток до 1,75 % цукрози, що вже містилися у всіх складах, що забезпечувало загальну кількість цукрози 4,15 % (вага/об'єм)), та гліцин при концентрації 72 мМ тестували з найкращими вибраними буферами (див. розділ, що стосується підбирання буфера). Ці концентрації максимально збільшували, щоб не перевищити осмоляльність складу фази I (165 мОсм/кг в FDS).

DSC

Результати DSC показали, що всі склади з 2,4 % цукрози та гліцином при 72 мМ були порівнянними з еталонним складом (наприклад, у випадку цукрози  $T_d1=65,7\text{ }^{\circ}\text{C}$  для фосфату при 1,75 мМ і  $65,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  для еталонного складу).

Дослідження динаміки рівня HMW за допомогою SEC

Невеликий позитивний вплив гліцину був підтверджений при порівнянні зі складами, що містили тільки цукрозу, для цитрату при 1,75 мМ і при відсутності буфера (див. фігуру 34). Однак цей позитивний вплив був значним тільки через 48 год. при RT.

Висновок

Відносно утворення HMW у тимчасових рамках, що представляють інтерес (< 24 год. при RT) склади з цукрозою та гліцином, тестовані з найкращими кандидатними буферами, були порівнянними зі складом фази I.

Висновки з прикладів 7-8

Для даного дослідження виготовляли приблизно 50 складів і порівнювали поряд з розглянутим складом фази I/IIa. Підбирання pH здійснювали в діапазоні від 6,2 до 7,4, і він включав всі буфери для ін'єкцій у межах цього діапазону pH, окремо або в комбінації з декількома наповнювачами (усі GRAS), для того, щоб оцінити можливі синергетичні взаємодії між наповнювачами.

Були зроблені наступні основні висновки:

- значення pH приблизно 6,2 знижують розчинність лідерного антитіла: спостерігалось утворення гелю та осадження для сукцинатного та гістидинового буферів, відповідно;

- крім того, слід уникати використання гістидинового буфера при pH 6,6, оскільки розчин опалесцював і був трохи менш термостабільним;

- у діапазоні pH від 6,6 до 7,4 був відсутній явний ефект pH відносно кінетичних показників утворення HMW;

- збільшення іонної сили спричиняло дестабілізуючий ефект відносно кінетичних показників утворення HMW;

- фосфатний і цитратний були найкращими буферами з тестованих за умови, що вони були присутні в низькій концентрації, такий як 1,75 mM;

- з усіх тестованих наповнювачів найкращий стабілізуючий ефект був отриманий для гліцину при 10 і 72 mM і 2,4 % цукрози. Однак стабілізуючий ефект не дозволив значно сповільнити утворення HMW, і

- пролін, який не спричиняв ефект при 10 mM, можна було використовувати як ізотонічний засіб (ефект проліну при 91 mM (концентрація проліну в складі FDS фази I) не оцінювали відносно утворення HMW (наприклад, шляхом оцінювання складу FDS фази I з проліном та без проліну).

На закінчення, результати з прикладів 7-8 не дозволили виявити нову комбінацію наповнювачів, яка могла б значно поліпшити розглянутий склад відносно утворення HMW. Тобто результати з прикладів 7-8 підтверджують результати з прикладів 1-6. Рекомендувалося залишити розглянутий склад фази I/IIa для досліджень фази IIb. Таким чином, розглянутий склад був наступним (див. таблицю 31): фосфат 6,5 mM/Tris 3,7 mM, pH 7,0, PS80 0,2 % (вага/об'єм), цукроза 5 % (вага/об'єм), пролін 3 % (вага/об'єм).

Таблиця 31

опис складу фази I/IIa/IIb

Компонент	Концентрація
Лідерне антитіло	100 мг/мл
Фосфат	6,5 mM
Tris	3,7 mM
Цукроза	5 % (вага/об'єм)
Пролін	3 % (вага/об'єм)
PS80	0,2 % (вага/об'єм)

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> SANOFI  
Carayon, Sophie  
Boussif, Otmane

<120> КОМПОЗИЦІЇ АНТИ-ІЛ-4/АНТИ-ІЛ-13 БІСПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ

<130> 14-646-WO

<150> US 61/816,899  
<151> 2013-04-29

<150> EP 14305160.5  
<151> 2014-02-05

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Anti-IL13 hB-B13 VL3

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr  
20 25 30

Gly Gln Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp  
65 70 75 80

Pro Val Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Ala  
85 90 95

Glu Asp Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 2  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Anti-IL13 hB-B13 VH2

<400> 2

Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Gly Gly

1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
 20 25 30  
 Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Glu Met Thr Ser Leu Arg Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 3  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> Anti-IL4 h8D4-8 VL1

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp  
 20 25 30  
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 4  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Anti-IL4 h8D4-8 VH1

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Arg Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 115 120

<210> 5  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Anti-IL4 h8D4-8 VH2

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg Leu Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65					70						75					80
Met	Gln	Leu	Arg	Ser <sub>85</sub>	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp <sub>90</sub>	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr <sub>95</sub>	Cys	
Thr	Arg	Leu	Lys <sub>100</sub>	Glu	Tyr	Gly	Asn	Tyr <sub>105</sub>	Asp	Ser	Phe	Tyr	Phe <sub>110</sub>	Asp	Val	
Trp	Gly	Ala <sub>115</sub>	Gly	Thr	Leu	Val	Thr <sub>120</sub>	Val	Ser	Ser	Ala					

```
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>  
<223> linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
1 5 10

```
<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Штучна послідовність
```

<220>  
<223> hB-B13 VL3 CDR1

<400> 7

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Gln Ser Tyr Met His  
1 5 10 15

<210>	8
<211>	7
<212>	PRT
<213>	Штучна послідовність

<220>  
<223> hB-B13 VL3 CDR2

<400> 8

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1 5

<210>	9
<211>	9
<212>	PRT
<213>	Штучна послідовність

<220>  
<223> hB-B13 VL3 CDR3

<400> 9

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr  
1 5

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> hB-B13 VH2 CDR1

<400> 10

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser Ser Ile Asn  
 1 5 10

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> hB-B13 VH2 CDR2

<400> 11

Asp Gly Arg Ile Asp  
 1 5

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> hB-B13 VH2 CDR3

<400> 12

Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VL1 CDR1

<400> 13

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser  
 1 5 10

<210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VL1 CDR2

<400> 14

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly



1 5

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VL1 CDR3

<400> 15

Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VH1 CDR1

<400> 16

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VH1 CDR2

<400> 17

Ile Asp Pro Ser Asp Gly Glu Thr Arg  
 1 5

<210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VH1 CDR3

<400> 18

Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність

<220>  
 <223> h8D4-8 VH2 CDR1

<400> 19

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His  
1 5 10

<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> h8D4-8 VH2 CDR2

<400> 20

Ile Asp Ala Ser Asp Gly Glu Thr Arg  
1 5

<210> 21  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> h8D4-8 VH2 CDR3

<400> 21

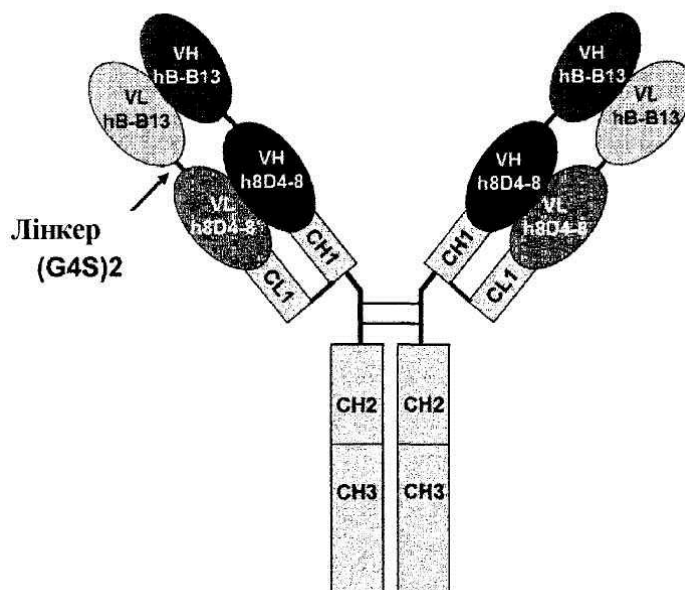
Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Стабільний склад на основі антитіла, що містить: біспецифічне антитіло до IL-4/IL-13 або його антигензв'язувальний фрагмент, що містять легкий ланцюг формули VL1-лінкер-VL2 і важкий ланцюг формули VH1-лінкер-VH2, де VL1 та VH1 утворюють антигензв'язувальний домен для IL-13, а VL2 та VH2 утворюють антигензв'язувальний домен для IL-4, де VL1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 1, VH1 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 2, VL2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 3 та VH2 містить послідовності CDR SEQ ID NO: 4 або 5; та
- 10 буферну систему, придатну для підтримання рН складу при приблизно рН 7; і де склад характеризується концентрацією солей 15 мМ або нижче з метою зниження іонної сили складу, і
- 15 де склад містить маніт.
2. Склад за п. 1, де: VL1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1; VH1 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2; VL2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і
- 20 VH2 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4 або 5.
3. Склад за п. 1, де легкий ланцюг має формулу N-VL1-лінкер-VL2-CL, де CL являє собою константний домен легкого ланцюга антитіла, і де важкий ланцюг має формулу N-VH1-лінкер-VH2-CH1-CH2-CH3, де CH2-CH3 відповідає Fc-доміну антитіла.
4. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де лінкер містить амінокислотну послідовність SEQ
- 25 ID NO: 6.
5. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент додатково містять домен константної ділянки.
6. Склад за п. 5, де домен константної ділянки вибраний з групи, що складається з CH1, CH2, CH3 і CL.
- 30 7. Склад за п. 1, де біспецифічне антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент являють собою гуманізоване біспецифічне антитіло IgG4 або його антигензв'язувальний фрагмент.
8. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де концентрація антитіла або його антигензв'язувального фрагмента становить 100 мг/мл.

9. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де буферна система містить щонайменше два буфери.
10. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де концентрація буферної системи становить 10 мМ.
- 5 11. Склад за п. 9, де буферна система містить Tris-буфер і фосфатний буфер.
12. Склад за п. 11, де концентрація Tris-буфера становить приблизно 3,7 мМ.
13. Склад за п. 11, де концентрація фосфатного буфера становить приблизно 6,3 мМ.
14. Склад за п. 11, де концентрація Tris-буфера становить приблизно 3,7 мМ, а концентрація фосфатного буфера становить приблизно 6,3 мМ.
- 10 15. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де склад додатково містить неіоногенну поверхнево-активну речовину.
16. Склад за п. 15, де концентрація неіоногенної поверхнево-активної речовини становить від 0,05 до 0,2 % (вага/об'єм).
17. Склад за п. 15, де неіоногенна поверхнево-активна речовина являє собою полісорбат.
- 15 18. Склад за п. 17, де полісорбат являє собою полісорбат 80.
19. Склад за п. 18, де концентрація полісорбату 80 становить від приблизно 0,05 до приблизно 0,2 % (вага/об'єм).
20. Склад за п. 19, де концентрація полісорбату 80 становить приблизно 0,2 % (вага/об'єм).
21. Склад за будь-яким з попередніх пунктів, де склад додатково містить цукор.
- 20 22. Склад за п. 21, де концентрація цукру становить 5 % (вага/об'єм).
23. Склад за п. 21, де цукор являє собою дисахарид.
24. Склад за п. 23, де дисахарид являє собою цукрозу.
25. Склад за п. 24, де концентрація цукрози становить 5 % (вага/об'єм).
26. Склад за п. 25, де концентрація маніту становить від 1 до 3 % (вага/об'єм).
- 25 27. Склад за п. 26, де концентрація маніту становить 3 % (вага/об'єм).
28. Склад за будь-яким з пп. 1-27, де склад являє собою ліофілізований склад.
29. Стабільний ліофілізований склад на основі антитіла, що містить:  
100 мг/мл біспецифічного антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, де антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить  
30 амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 2 і 4, та  
варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 1 і 3;  
10 мМ буферної системи, де буферна система містить Tris-буфер у концентрації приблизно 3,7 мМ і фосфатний буфер у концентрації приблизно 6,3 мМ;  
0,2 % (вага/об'єм) полісорбату 80;  
35 5 % (вага/об'єм) цукрози та  
3 % (вага/об'єм) маніту,  
де рН складу становить приблизно рН 7.

Фігура 1



## Фігура 2

VL3 антитіла hB-B13 до IL-13 (SEQ ID NO: 1)

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISC**RASESVD SYGQSYMH**WY QOKAGOPPKL  
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**  
TFGGGTKLEI K

VH2 антитіла hB-B13 до IL-13 (SEQ ID NO: 2)

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVS**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLG  
IWG**DGRIDYA** DALKSRISIS KDSKSKQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARDGY  
FPYAMDFWGQ GTSVTVSS

VL1 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTC**HASQNI**D VWLSWFQKP GNIPKLLIYK  
**ASNLHTG**VPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ AHSYPFT**EGG  
GTKLEIKR

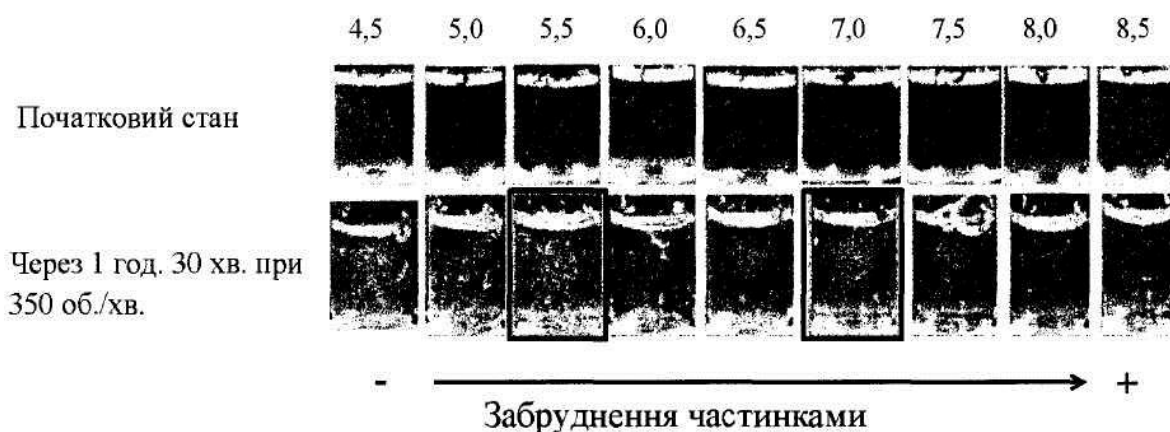
VH1 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 4)

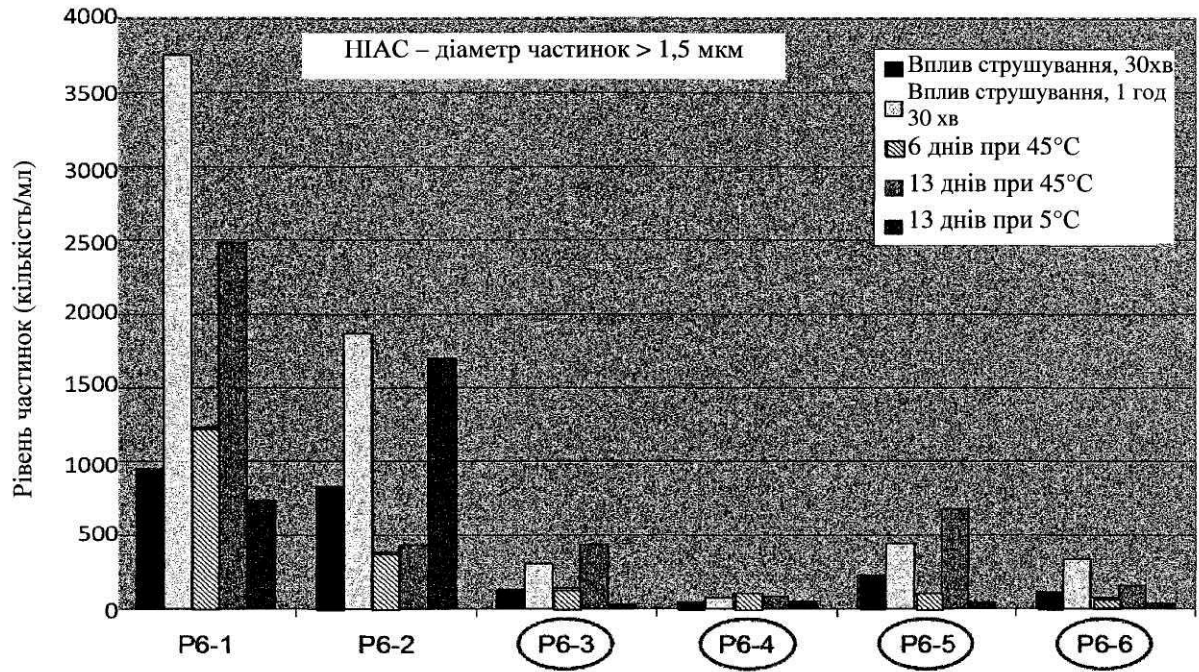
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIHWIK**QR PGQGLEWIGM  
**IDPSDGETRL** NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
**EYGNYSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

VH2 антитіла h8D4-8 до IL-4 (SEQ ID NO: 5)

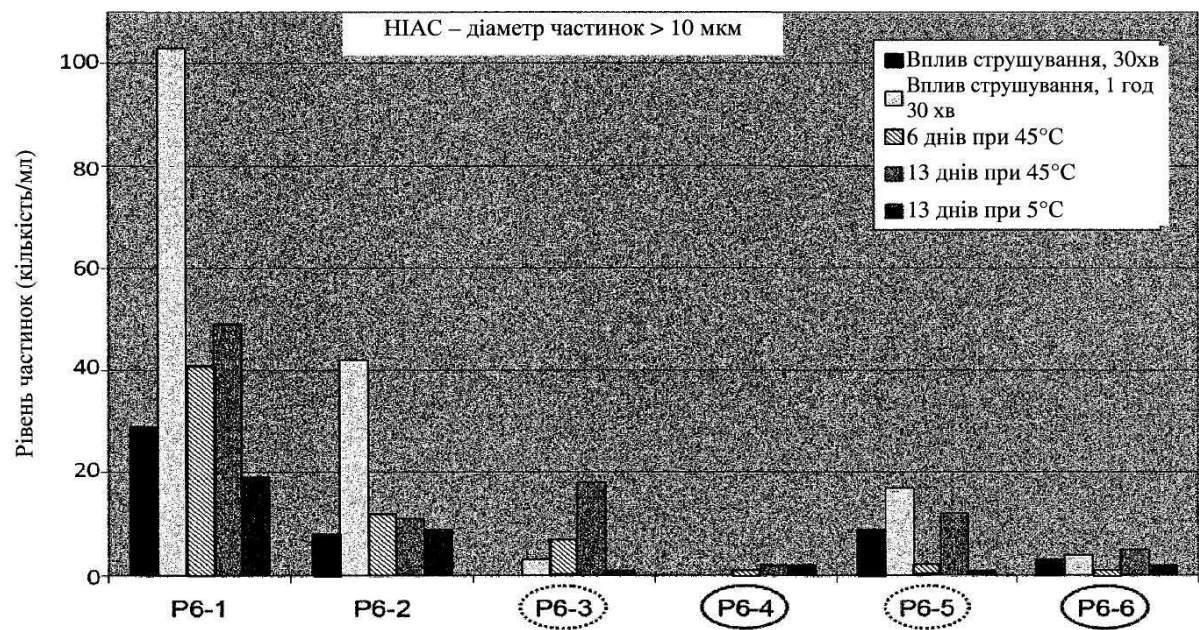
QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT SYWIHWIK**QR PGQGLEWIGM  
**IDASDGETRL** NQRFQGRATL TVDE**ST**STAY MQLRSPTSED SAVYYCTRLK  
**EYGNYSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

## Фігура 3



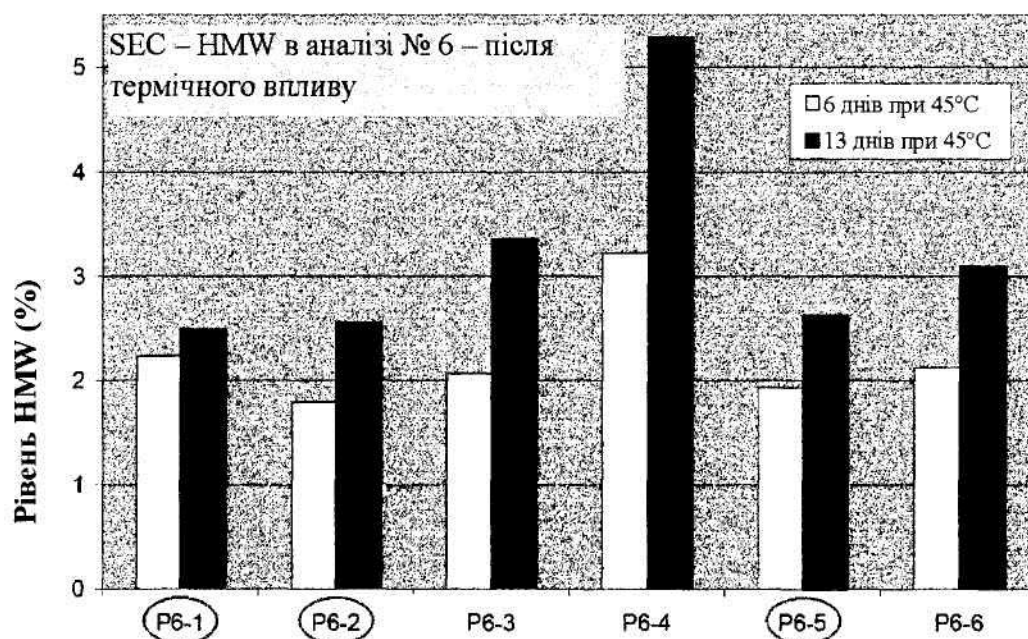


Фіг. 4

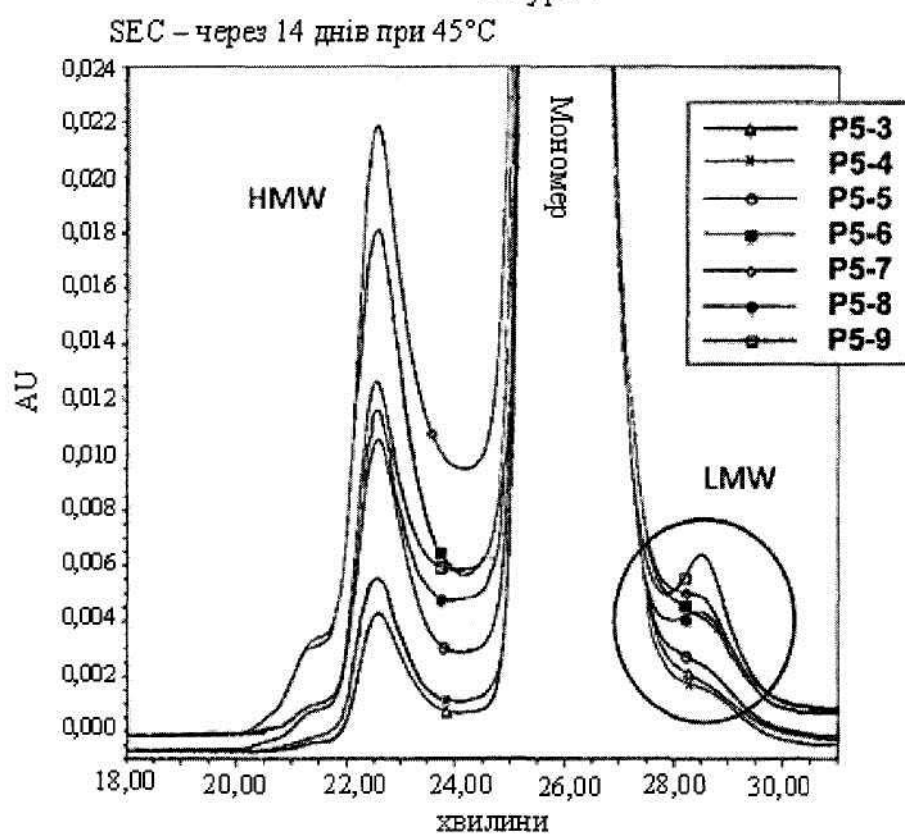


Фіг. 5

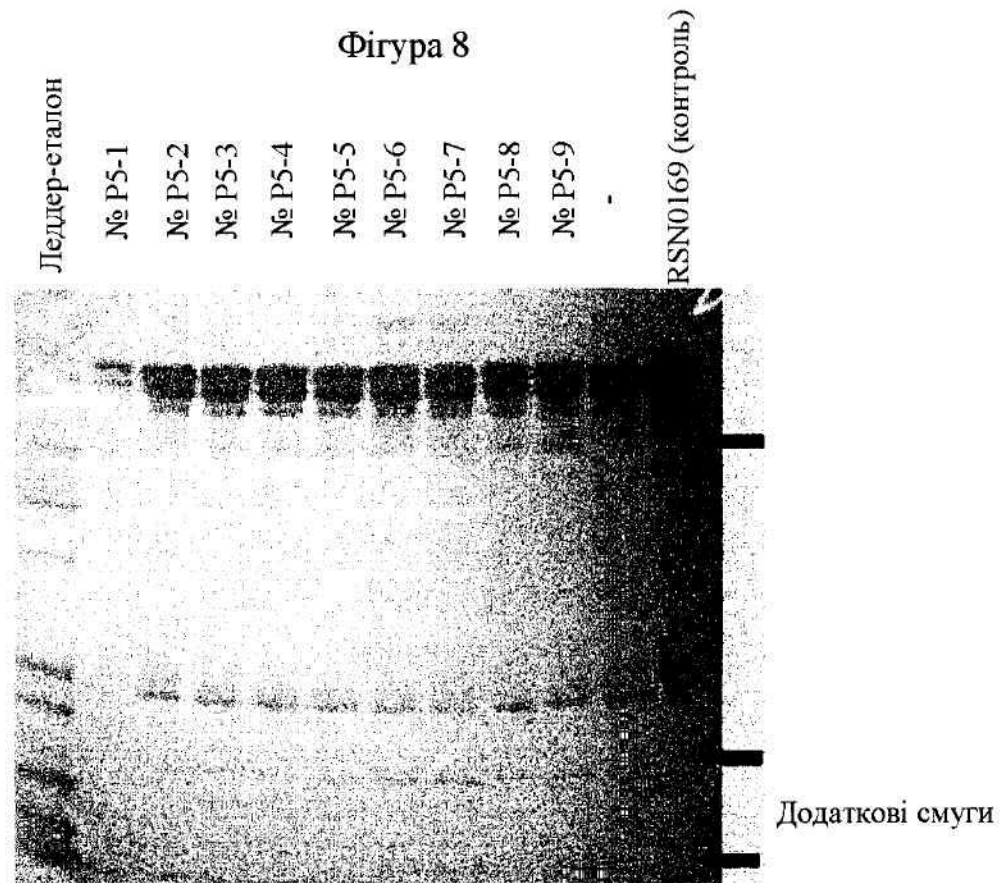
Фігура 6



Фігура 7



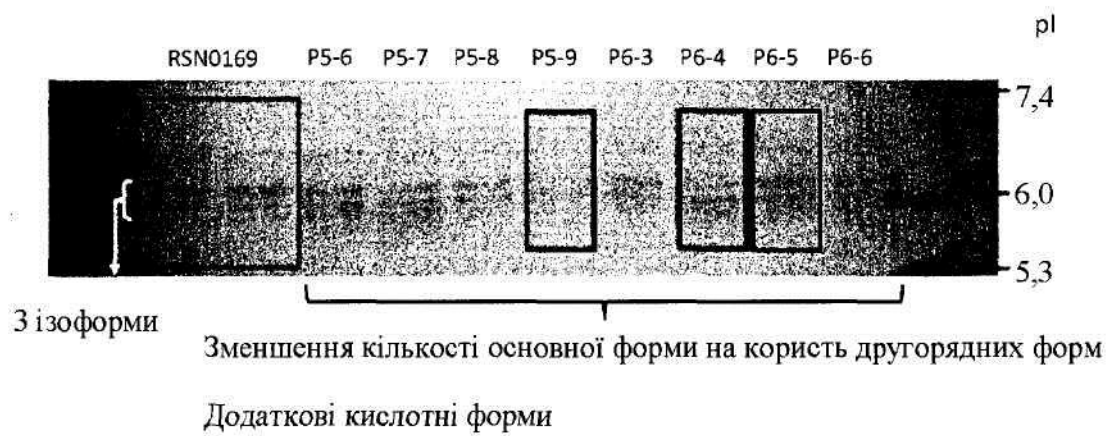
Фігура 8



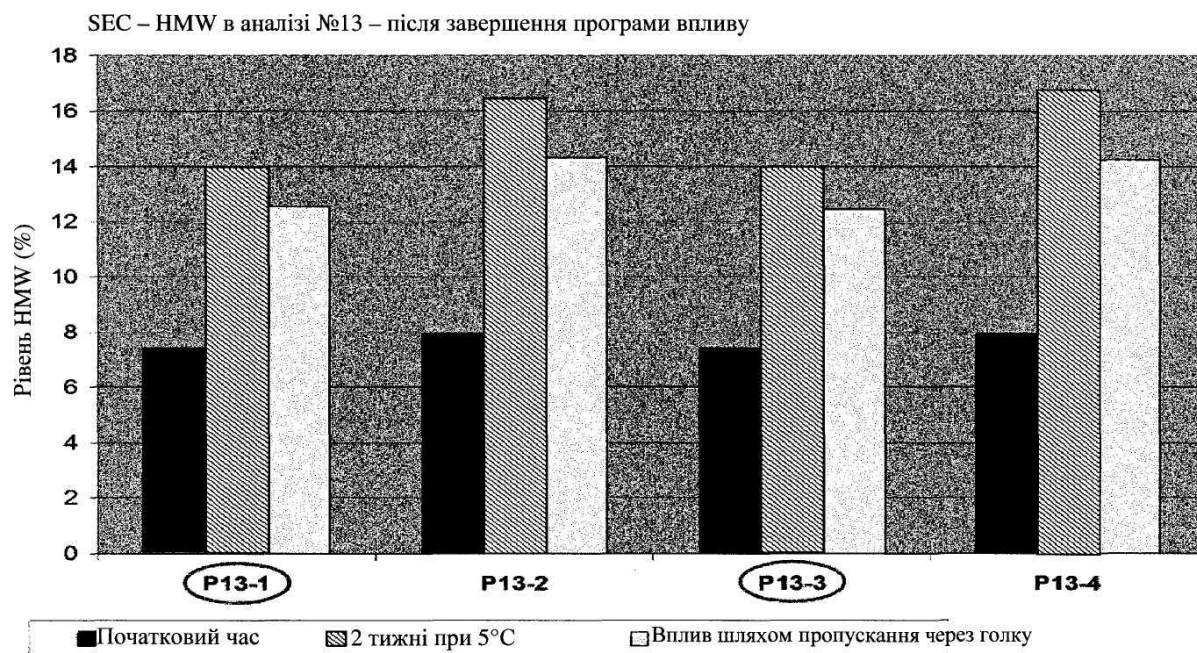
SDS-PAGE: 2 тижні при 45°C

Фігура 9

IEF через 2 тижні при 45°C

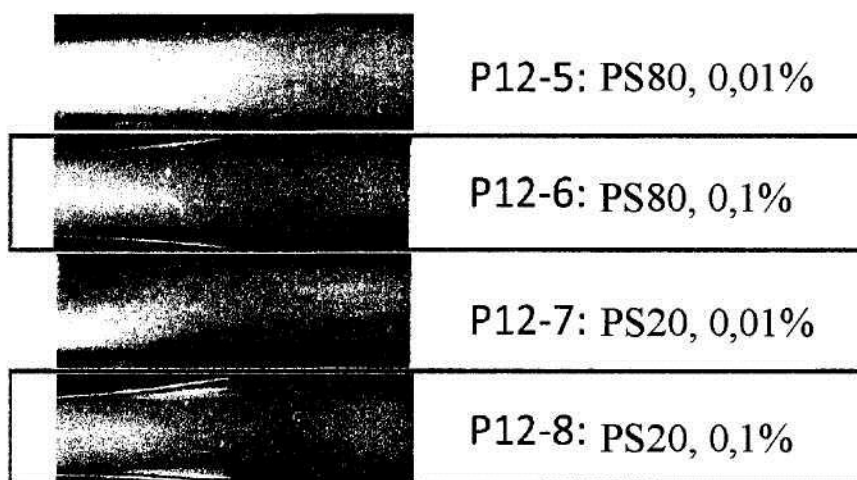




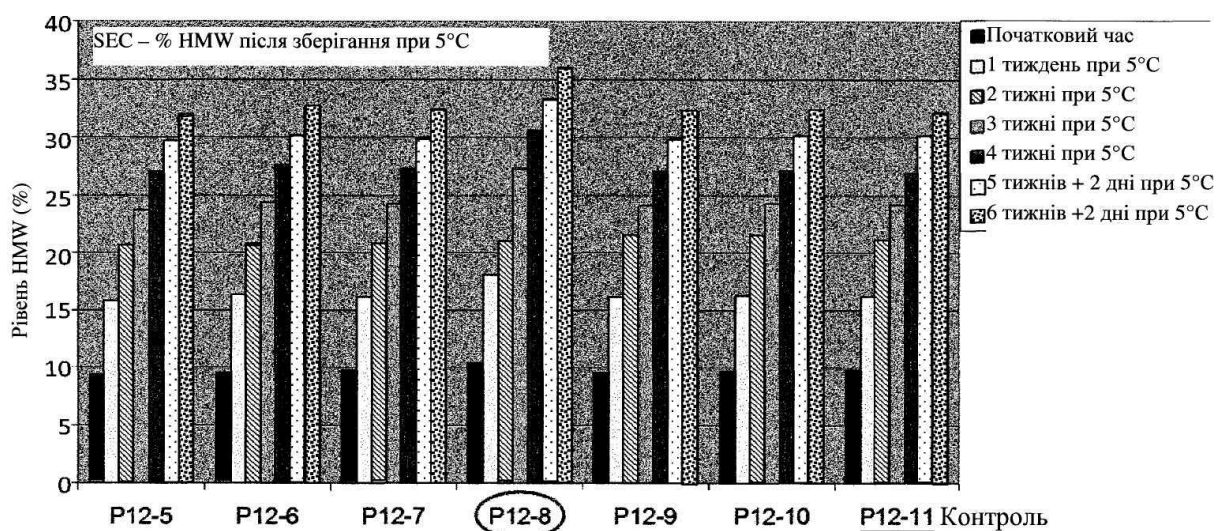


Фіг. 10

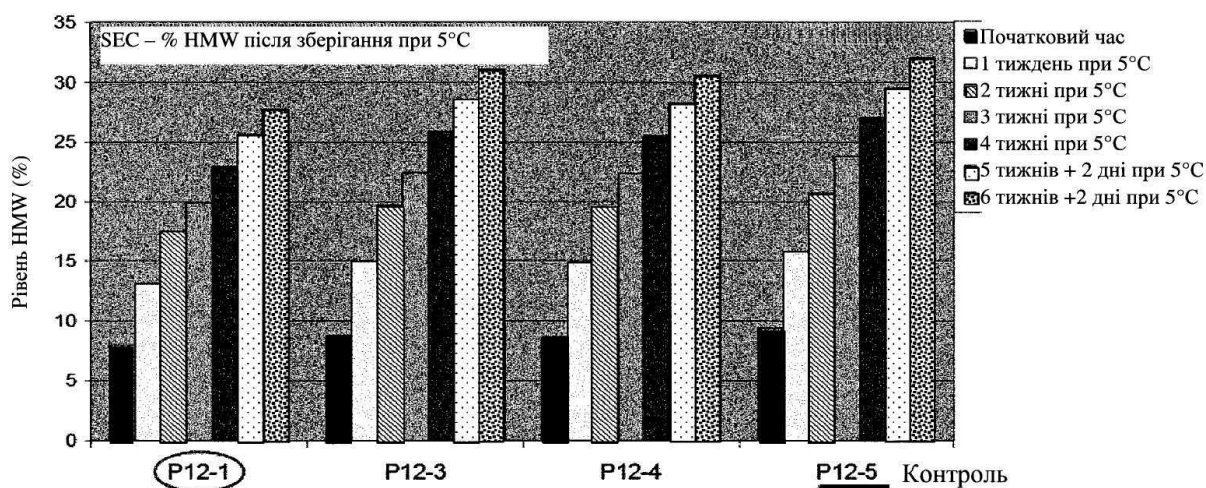
Фігура 11



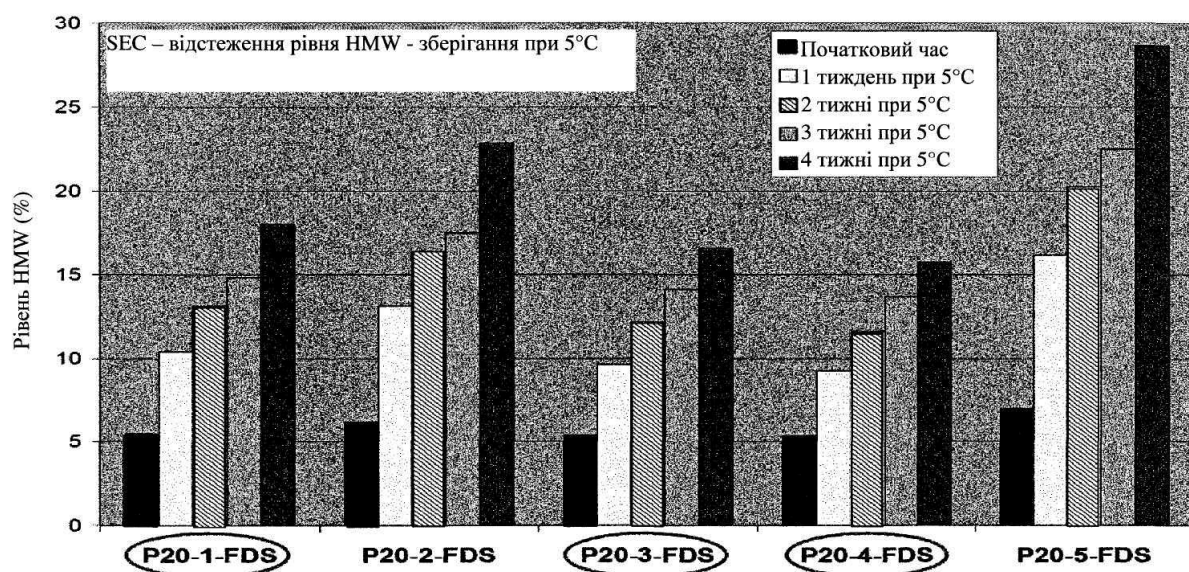




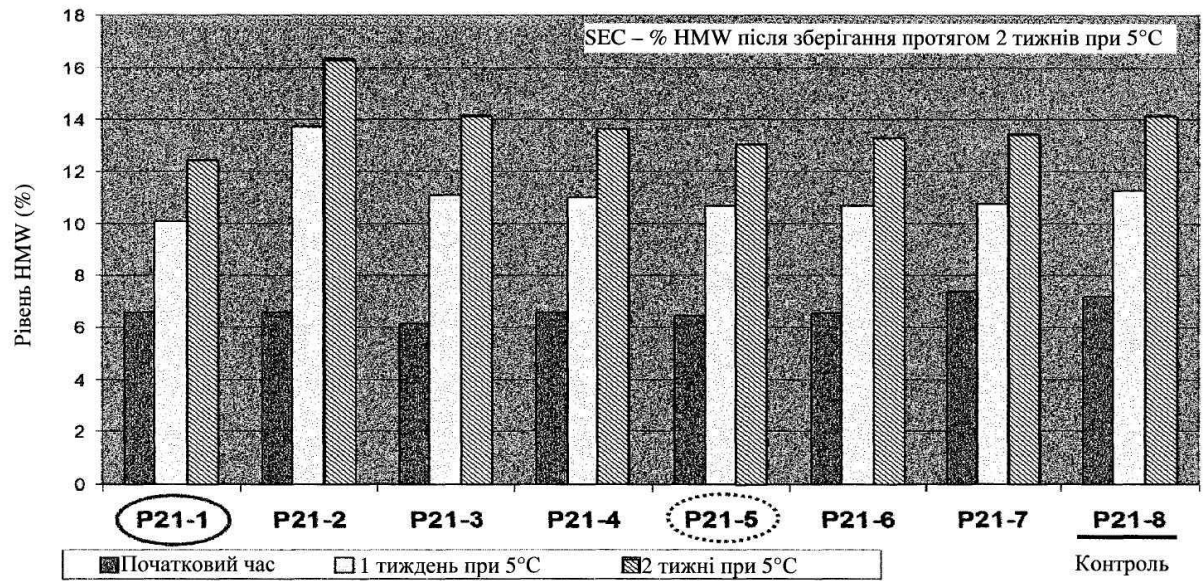
Фіг. 12



Фіг. 13

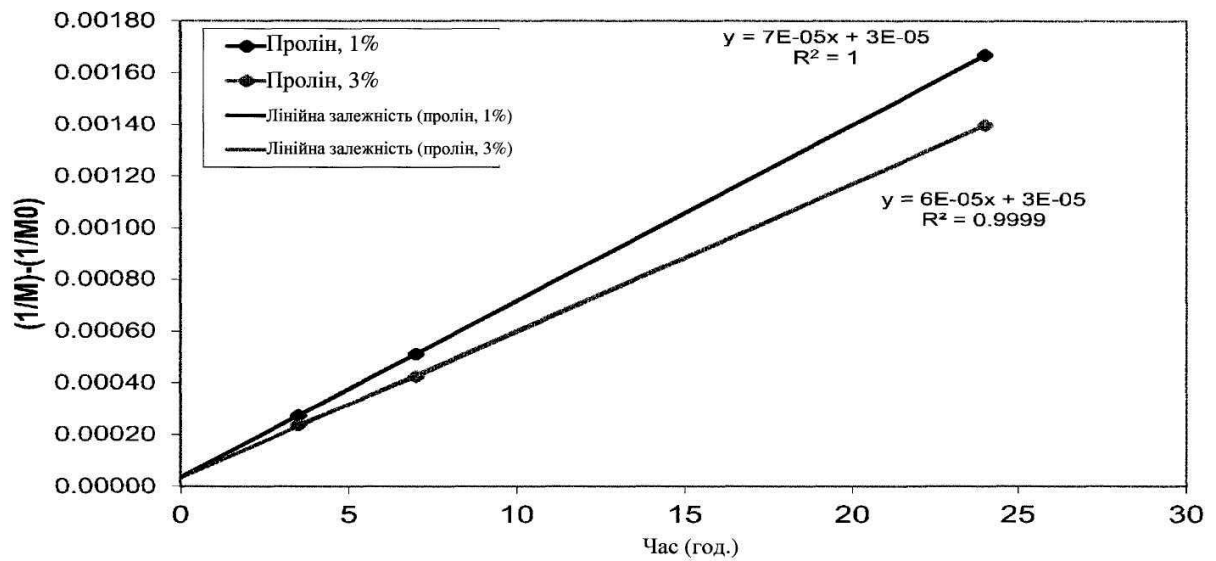


Фіг. 14



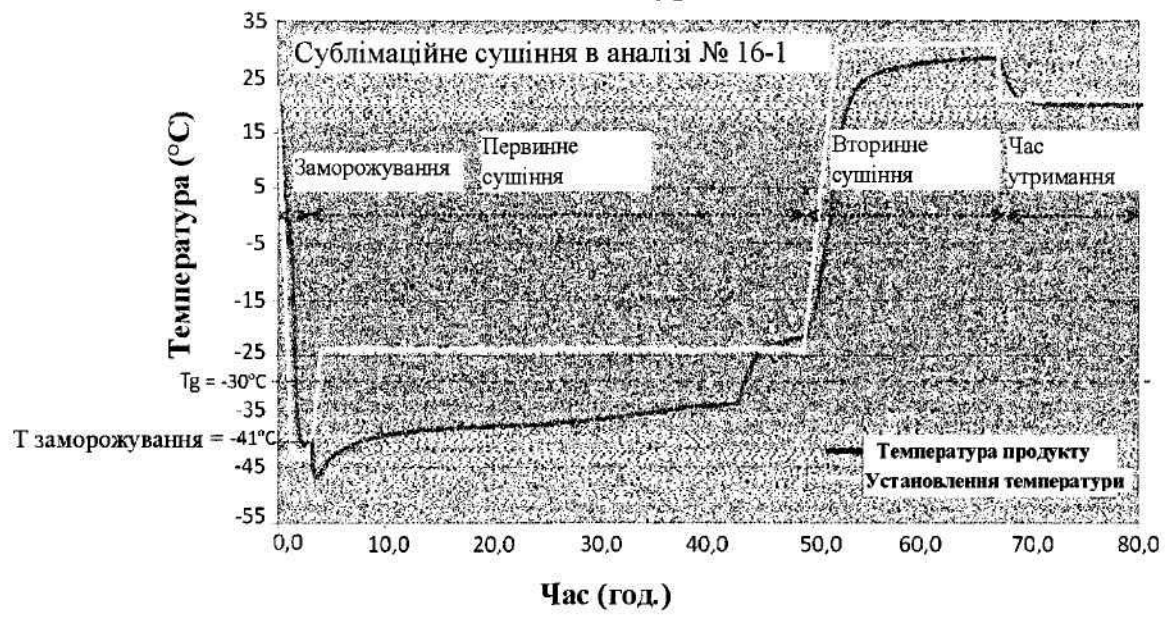
Фіг. 15

Динаміка  $(1/M - 1/M_0)$  залежно від часу при  $T=25^\circ\text{C}$

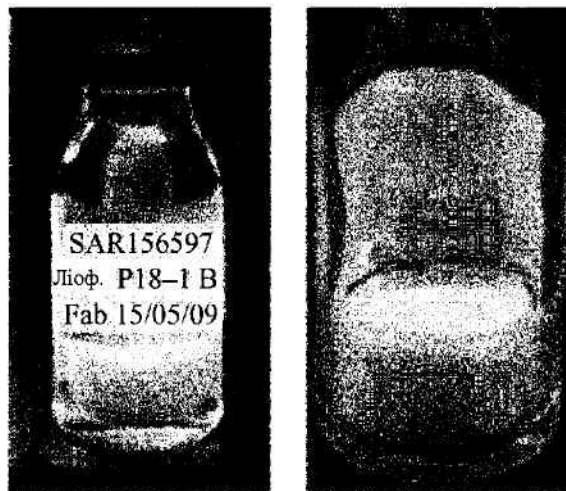


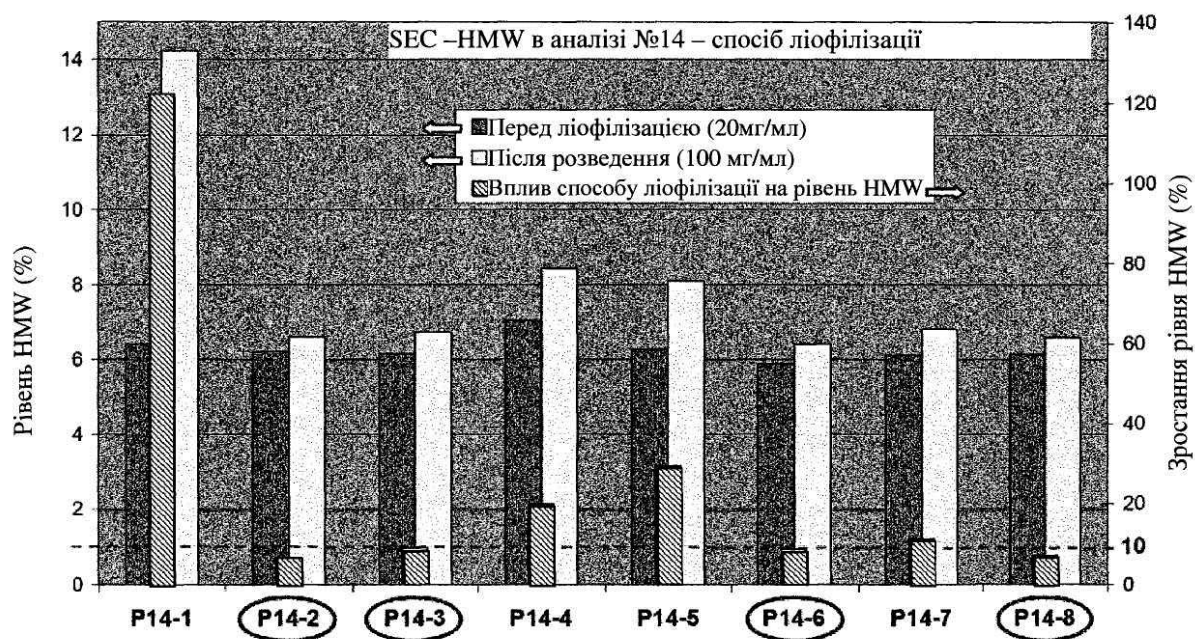
Фіг. 16

Фігура 17

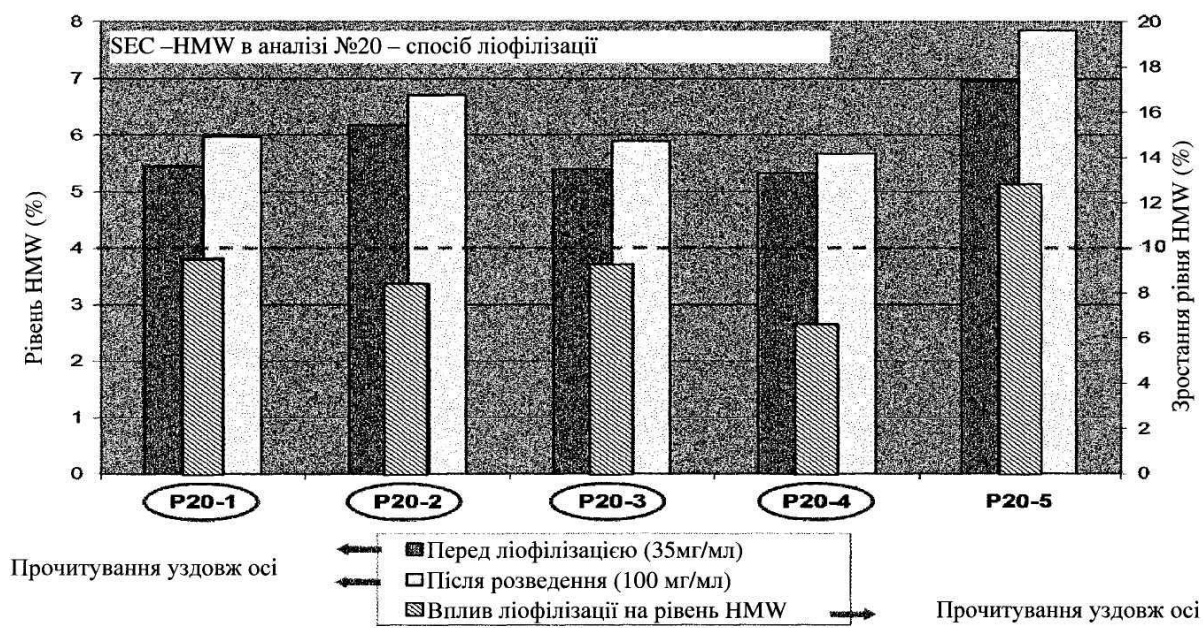


Фігура 18





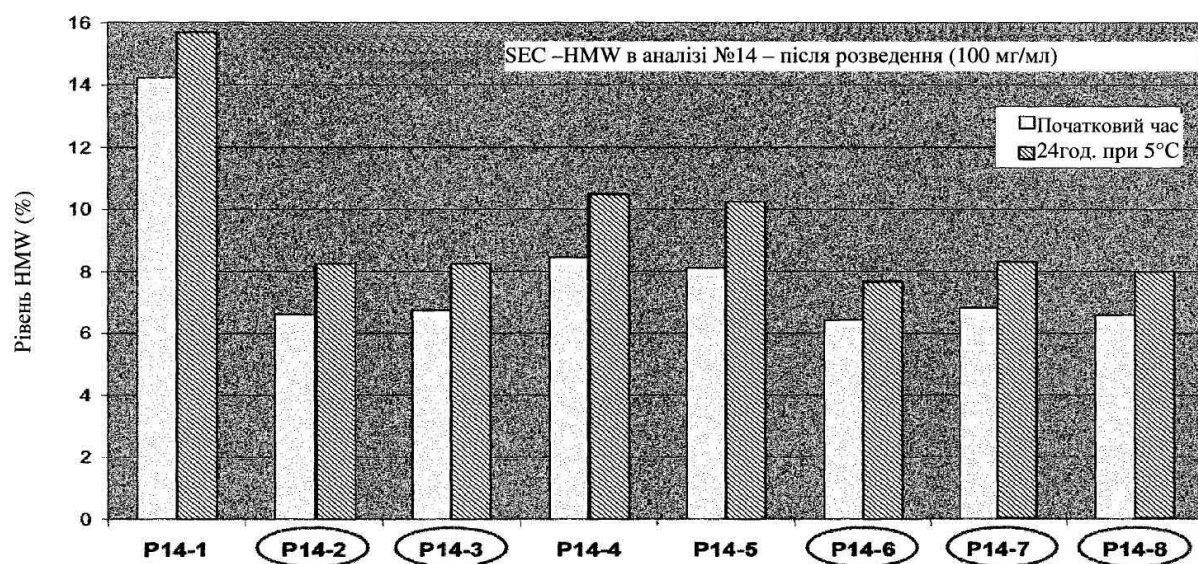
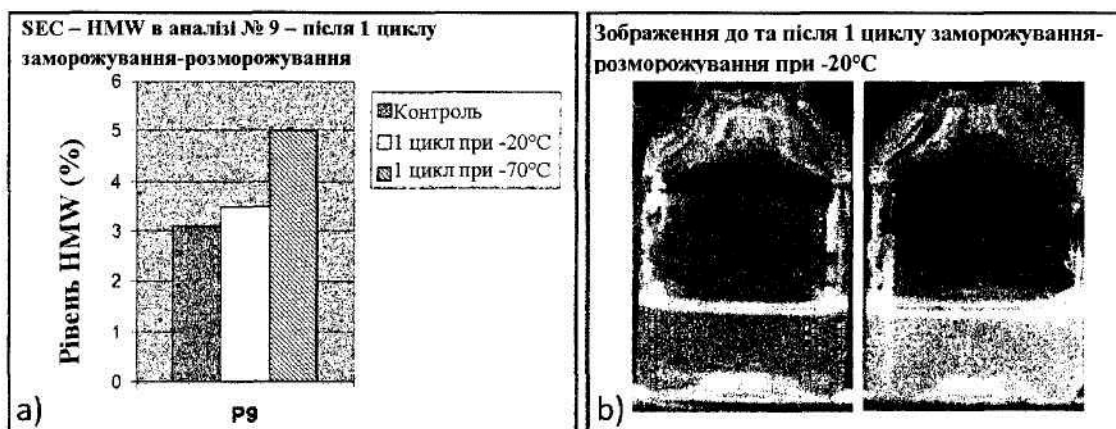
Фіг. 19



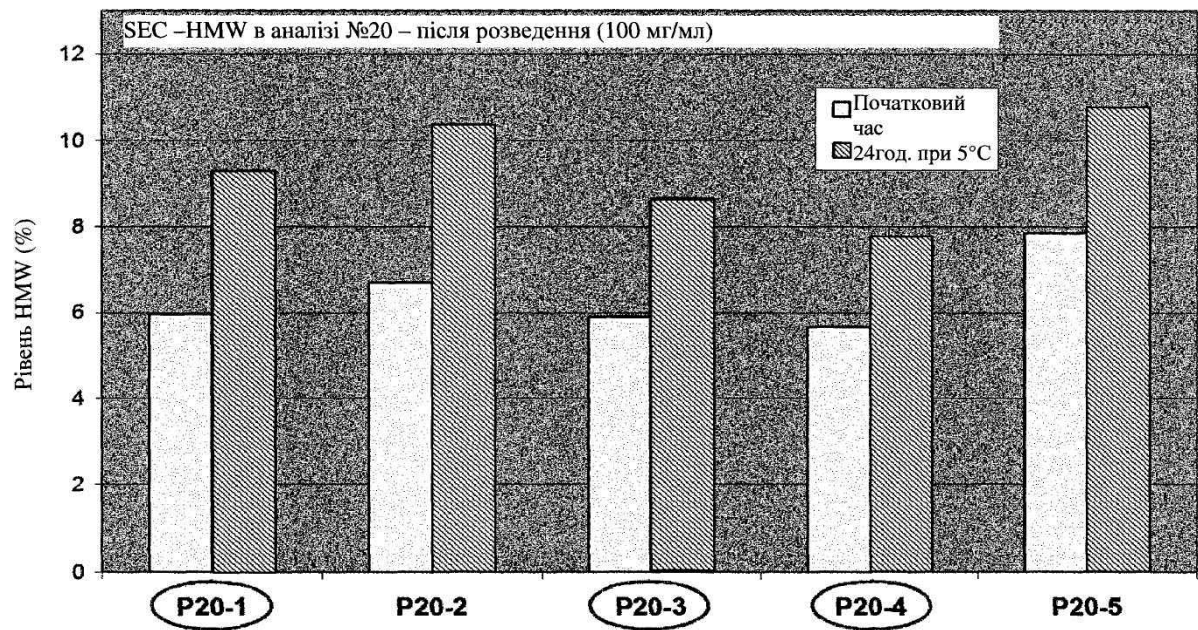
Фіг. 20



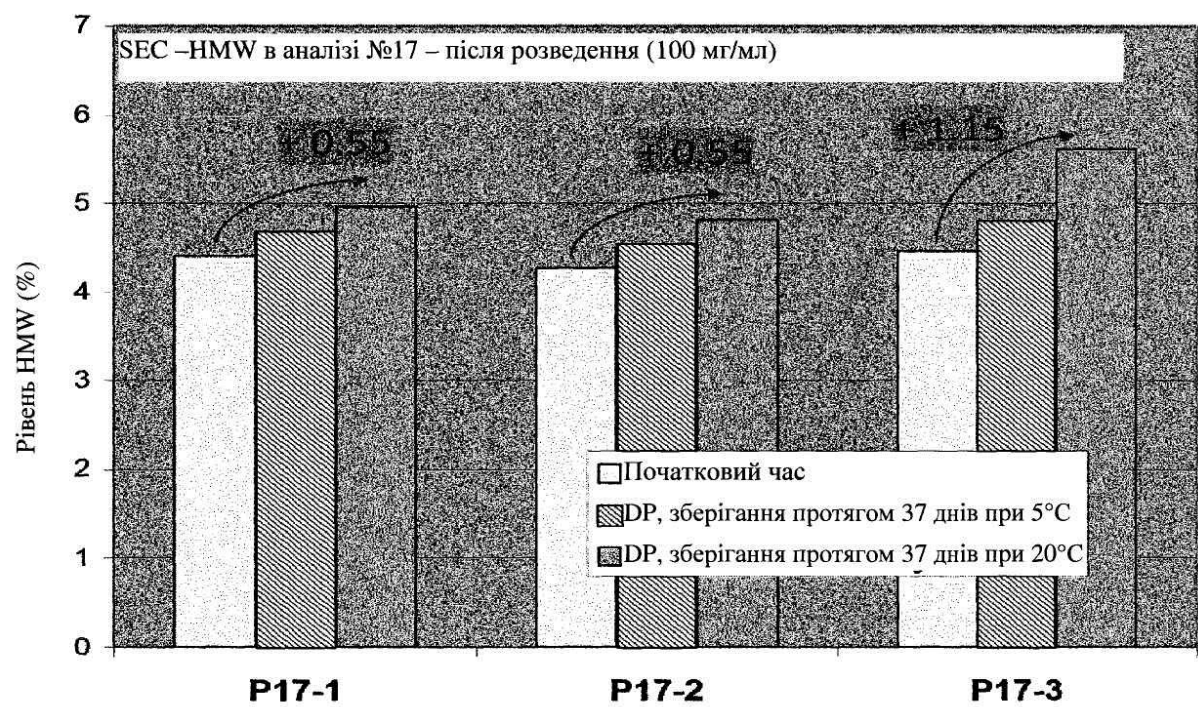
Фігура 21



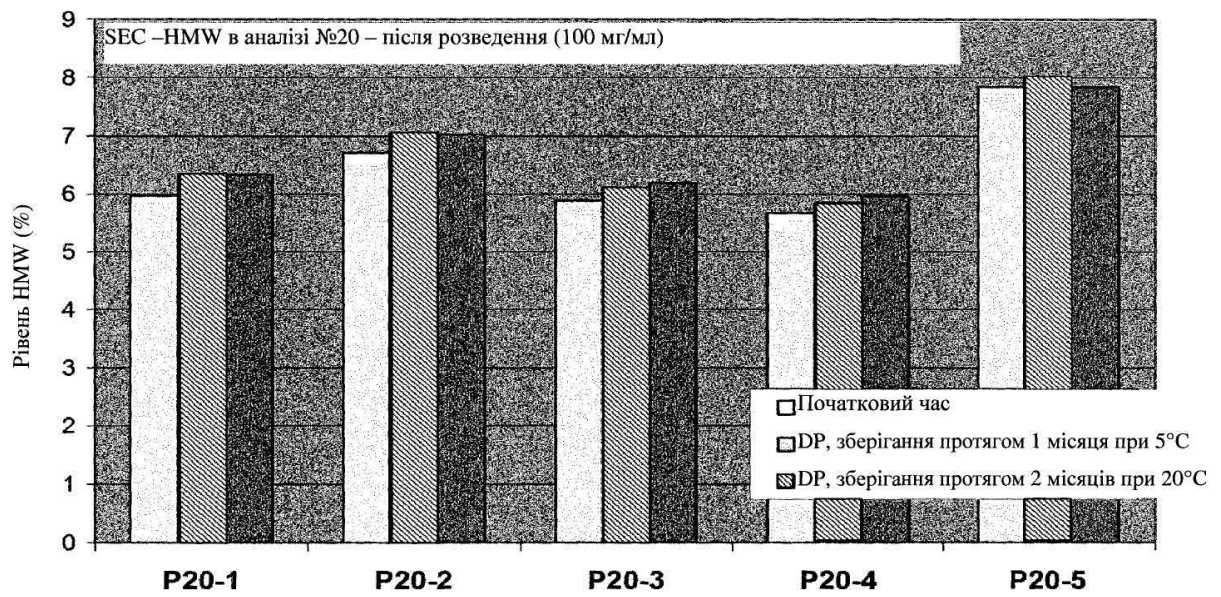
Фіг. 22



Фіг. 23

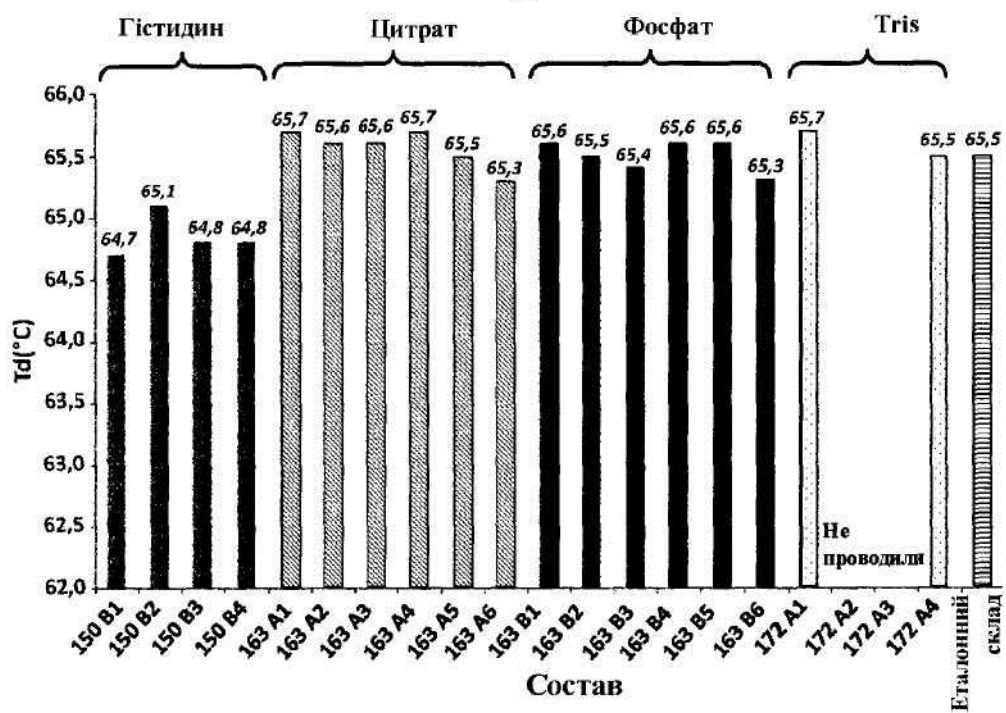


Фіг. 24

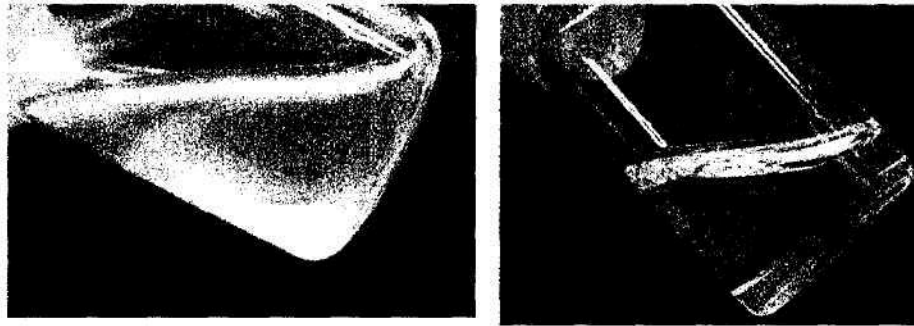


Фіг. 25

Фігура 26



Фігура 27

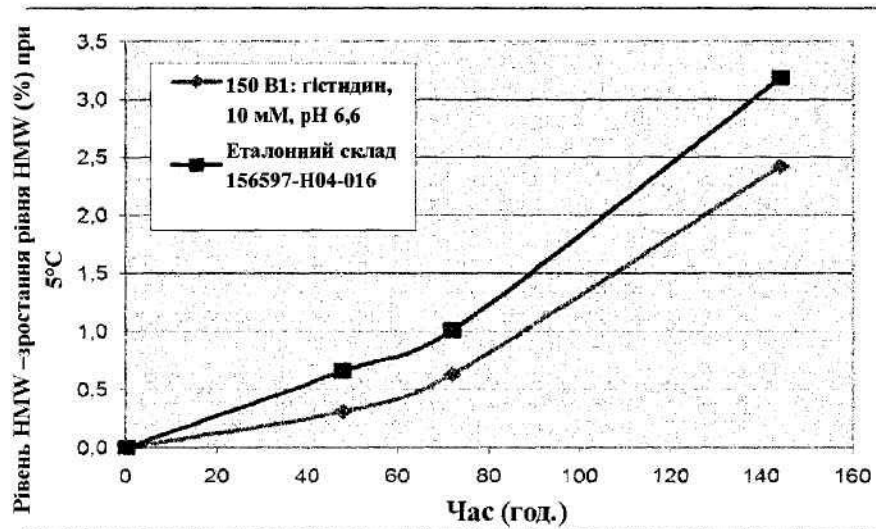


Гістидин, RT

Сукцинат, 5°C

Фігура 28А

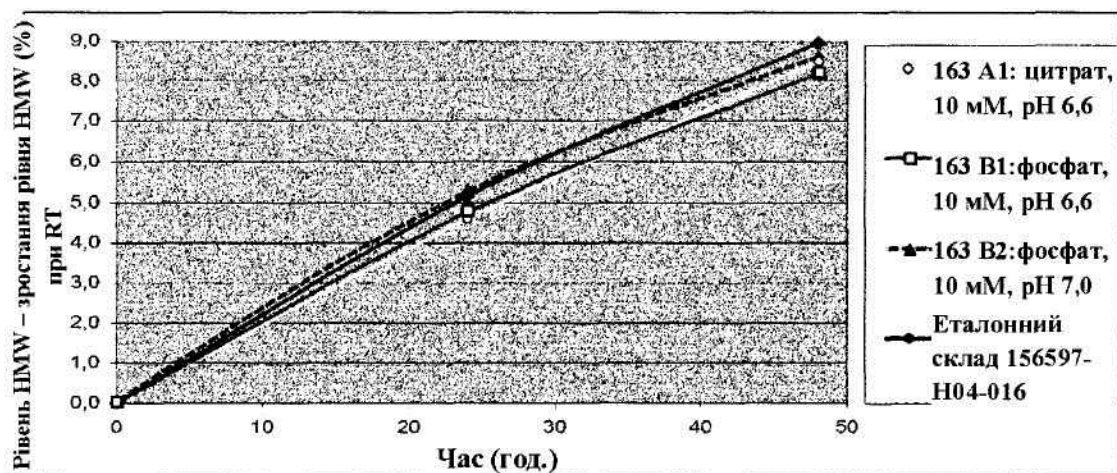
Час (год.)	Δ НМВ при 5°C	
	150 В1: гістидин, 10 мМ, рН 6,6	Еталонний склад 156597-Н04-016
0	0,0	0,0
48	0,3	0,7
72	0,6	1,0
144	2,4	3,2





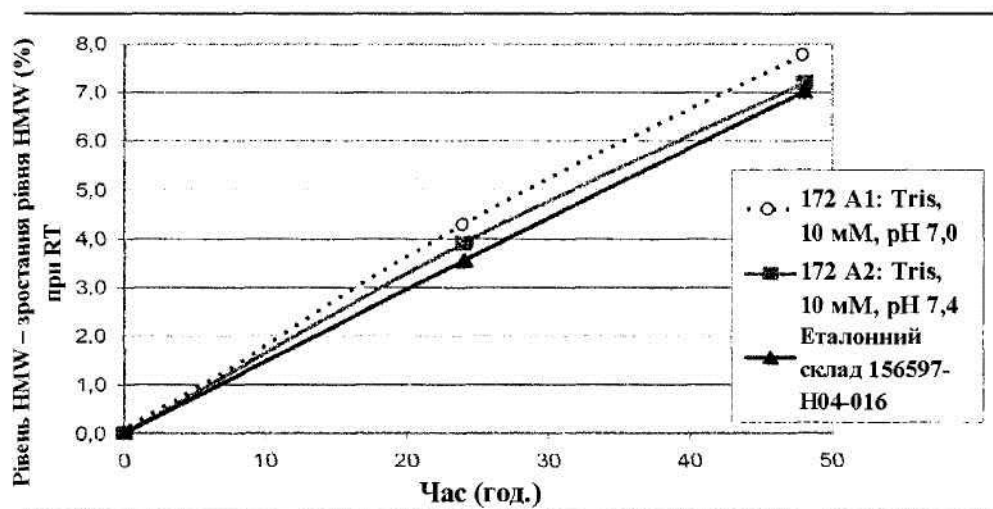
Фігура 28В

Час (год.)	Δ НМW при RT			
	163 A1: цитрат, 10 мМ, рН 6,6	163 B1: фосфат, 10 мМ, рН 6,6	163 B2: фосфат, 10 мМ, рН 7,0	Еталонний склад 156597- Н04-016
0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	4,6	4,8	5,3	5,2
48	8,5	8,2	8,7	9,0

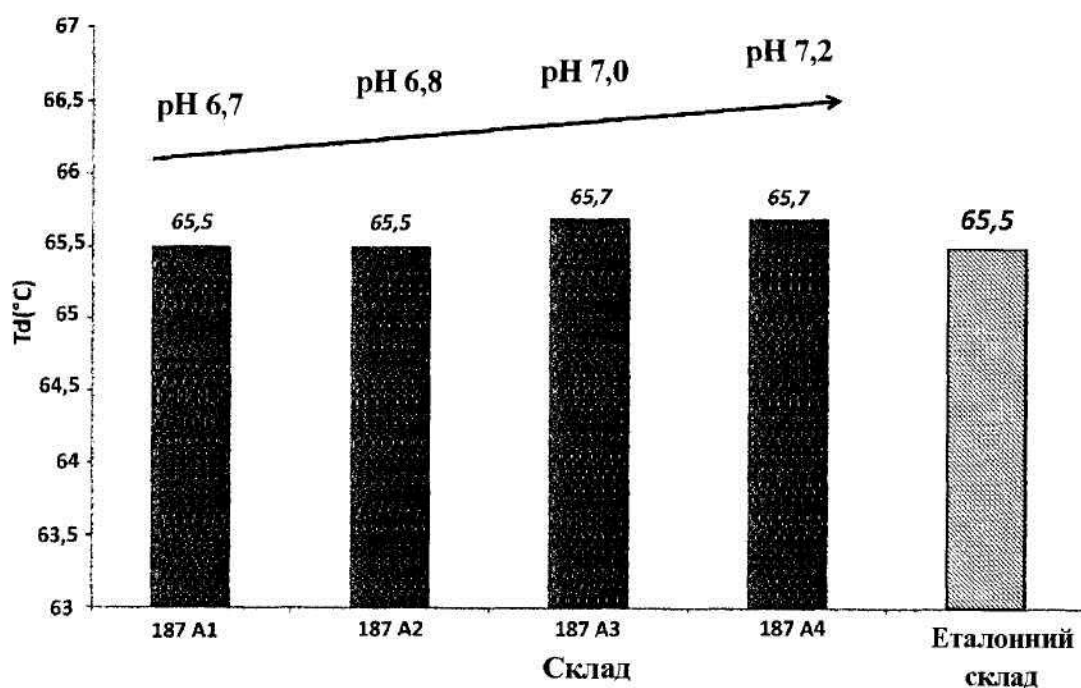


Фігура 28С

Час (год.)	Δ НМW при RT		
	172 A1: Tris, 10 мМ, рН 7,0	172 A2: Tris, 10 мМ, рН 7,4	Еталонний склад 156597- Н04-016
0	0,0	0,0	0,0
24	4,2	3,9	3,6
48	7,8	7,2	7,0

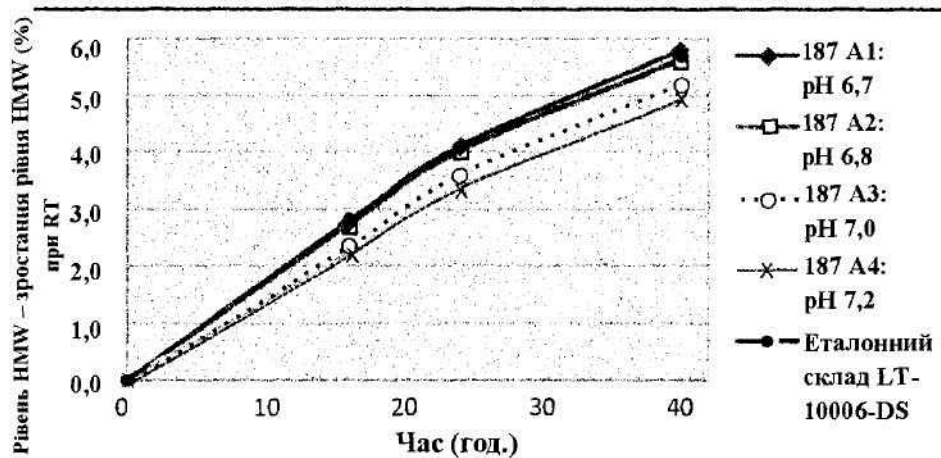


Фігура 29

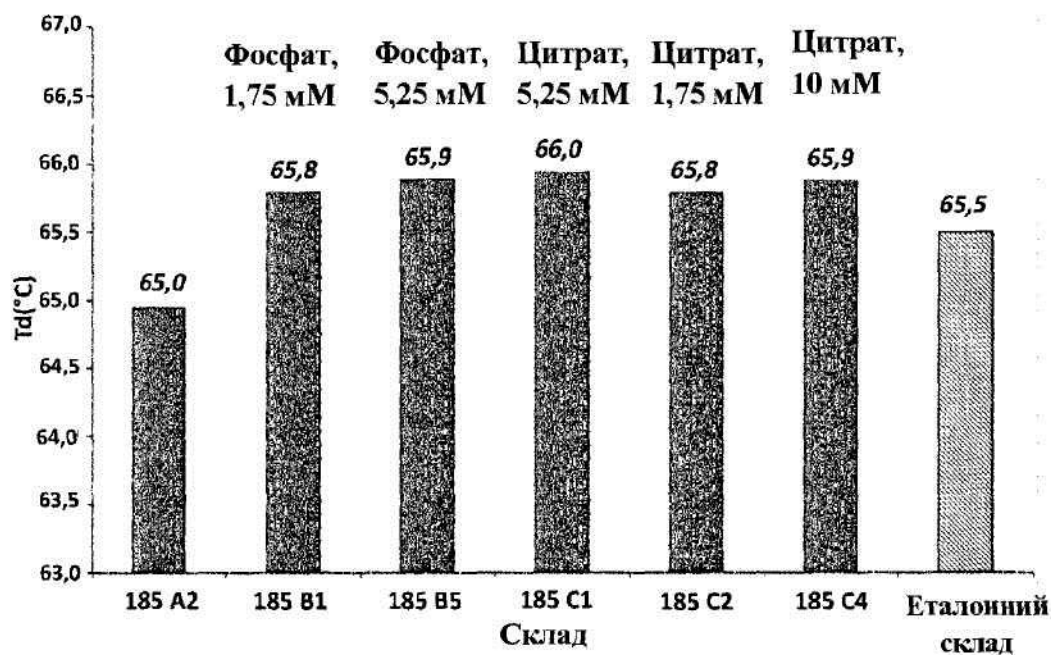


Фігура 30

Час (год.)	$\Delta$ HMW при RT				
	187 A1: pH 6,7	187 A2: pH 6,8	187 A3: pH 7,0	187 A4: pH 7,2	Еталонний склад LT- 10006-DS
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	2,8	2,7	2,4	2,2	2,8
24	4,1	4,0	3,6	3,4	4,0
40	5,8	5,7	5,2	4,9	5,6

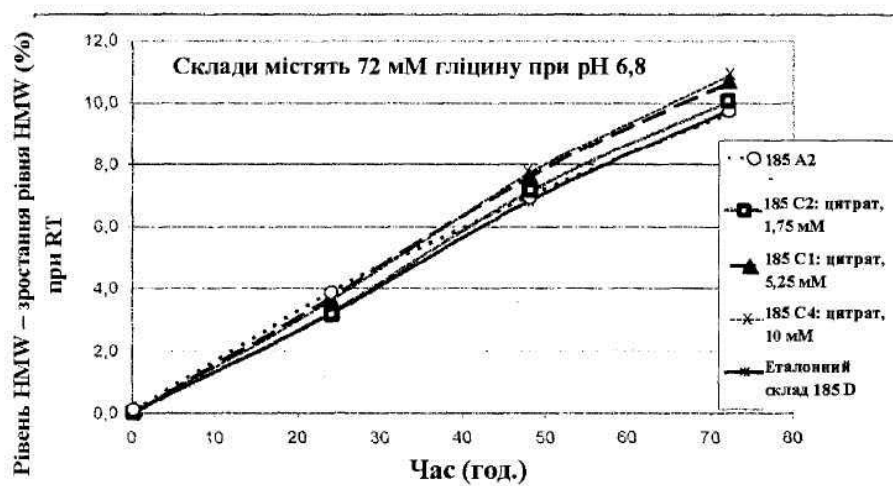


Фігура 31



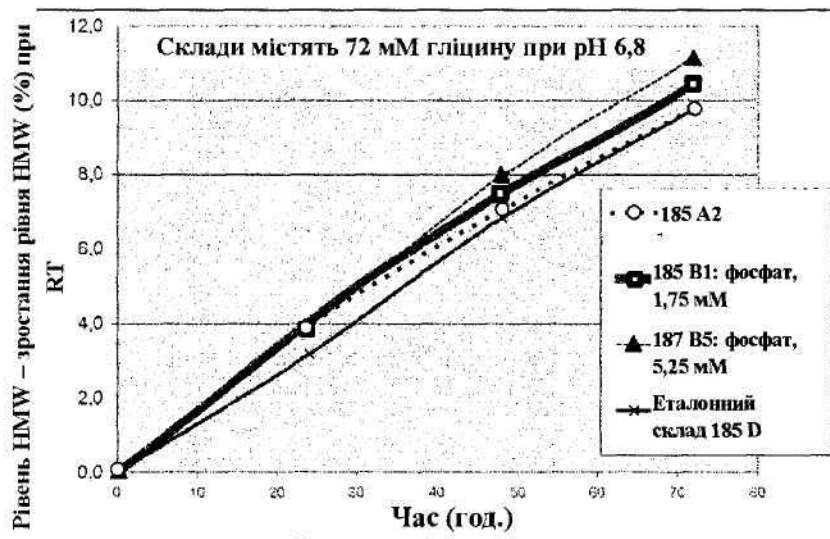
Фігура 32А

Час (год.)	Δ НМВ при RT				
	185 A2	185 C2: цитрат, 1,75 мМ	185 C1: цитрат, 5,25 мМ	185 C4: цитрат, 10 мМ	Еталонний склад 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	3,2	3,8	3,7	3,2
48	7,0	7,1	7,7	7,8	6,8
72	9,8	10,1	10,8	11,0	9,8



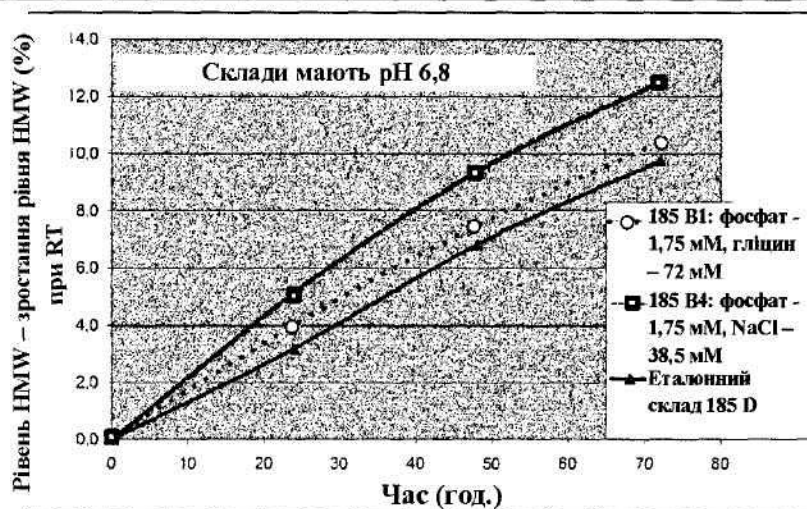
Фігура 32В

Час (год.)	Δ НМW при RT			
	185 A2	185 B1: фосфат, 1,75 мМ	187 B5: фосфат, 5,25 мМ	Еталонний склад 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	4,0	3,9	3,2
48	7,0	7,5	8,0	6,8
72	9,8	10,4	11,2	9,8



Фігура 33

Δ НМВ при RT			
Час (год.)	185 В1: фосфат - 1,75 мМ, гліцин – 72 мМ	185 В4: фосфат - 1,75 мМ, NaCl – 38,5 мМ	Еталонний склад 185 D
0	0,0	0,0	0,0
24	4,0	5,2	3,2
48	7,5	9,4	6,8
72	10,4	12,5	9,8



Фігура 34

Δ НМВ при RT							
Час (год.)	185 А2 Гліцин, 72 мМ	185 А1 Цукроза, 2,4%	185 В1 Фосфат, 1,75 мМ Гліцин, 72 мМ	185 В2 Фосфат, 1,75 мМ Цукроза, 2,4%	185 С2 Цитрат, 1,75 мМ Гліцин, 72 мМ	185 С3 Цитрат, 1,75 мМ Цукроза, 2,4%	Еталонний склад 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	4,1	4,0	4,2	3,2	4,1	3,2
48	7,0	7,5	7,5	7,5	7,1	7,9	6,8
72	9,8	10,1	10,4	10,4	10,1	10,9	9,8

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601