УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129583** (13) **C2**

(51) МПК (2025.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 35/00
C07K 16/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2019 10020**

(22) Дата подання заявки: **06.03.2018**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **12.06.2025**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17159354.4**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **06.03.2017**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.01.2020, Бюл.№ 1**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **11.06.2025, Бюл.№ 24**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT **PCT/EP2018/055404, 06.03.2018**

(72) Винахідник(и):
Рінальді Джанлука (IT),
Фратарканжелі Сільвія (IT),
Шопік Майкл Джеймс (IT),
Дель Ріо Алессандра (IT)

(73) Володілець (володільці):
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ,
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany (DE),
ПФАЙЗЕР ІНК.,
235 East 42nd Street, New York, NY 10017, United States of America (US)

(74) Представник:
Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2013/079174 A1, 06.06.2013
WO 2015/048520 A1, 02.04.2015
WO 2012/135408 A1, 04.10.2012
WO 2016/200835 A1, 15.12.2016
DAUGHERTY A.L., MRSNY R.J. Chapter 8: Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics // Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing. Springer, US, 2010. P. 103-129 DOI 10.1007/978-0-387-76643-0_8
WO 2017/097407 A1, 15.06.2017

(54) ВОДНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ СКЛАД, ЯКИЙ МІСТИТЬ АНТИТІЛО ПРОТИ PD-L1 АВЕЛУМАБ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до нового складу антитіла проти PD-L1. Зокрема, винахід належить до водного фармацевтичного складу антитіла проти PD-L1 авелумабу.

UA 129583 C2

Даний винахід відноситься до нового складу антитіла проти PD-L1. Зокрема, винахід відноситься до водного фармацевтичного складу антитіла проти PD-L1 Авелумабу.

Передумови створення винаходу

Рецептор запрограмованої смерті 1 (PD-1) і ліганди 1 і 2 PD-1 (PD-L1, PD-L2) відіграють важливу роль в імунній регуляції. Експресований на активованих Т-клітинах, PD-1 активується за допомогою PD-L1 і PD-L2, які експресуються стромальними клітинами, пухлинними клітинами або обома видами клітин, ініціюючи Т-клітинну смерть і локалізовану імунну супресію (Dong H, Zhu Г, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med 1999;5:1365-69; Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, та інш. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med 2000;192:1027-34; Dong H, Strome SE, Salomao DR, та інш. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med 2002; 8:793-800. Erratum, Nat Med 2002;8:1039; Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol 2012;24:207-12), потенційно забезпечуючи імунно-толерантне середовище для розвитку і зростання пухлини. І навпаки, інгібування цієї взаємодії може посилювати локальні реакції відповіді Т-клітин і опосередковувати протипухлинну активність на неклінічних моделях тварин (Dong H, Strome SE, Salomao DR, та інш. Nat Med 2002; 8:793-800. Erratum, Nat Med 2002;8:1039; Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, та інш. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:12293-97). В клінічних умовах повідомляли, що лікування антитілами, які блокують взаємодію PD-1 – PD-L1, дає об'єктивні показники реакцій відповіді від 7 % до 38 % у пацієнтів з пізніми стадіями або метастатичними солідними пухлинами з прийнятними профілями безпеки (Hamid O, Robert C, Daud A, та інш. Safety and tumor responses with lambrolizumab (Anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med 2013;369:134-44; Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, та інш. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med 2012;366(26):2455-65; Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, та інш. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med 2012;366(26):2443-54; Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, та інш. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature 2014;515:563-67). Є примітним, що для більшості пацієнтів відповіді виявились довгими, з тривалістю в 1 рік або більше.

Авелумаб (також відомий як MSB0010718C) являє собою повністю людське моноклональне антитіло імуноглобуліну (Ig) ізотипу G1. Авелумаб селективно зв'язується з PD- і конкурентно блокує його взаємодію з PD-1.

У порівнянні з антитілами проти PD-1, які націлені на Т-клітини, Авелумаб націлений на пухлинні клітини і тому очікують, що він буде мати менше побічних ефектів, включаючи більш низький ризик пов'язаних з аутоімунною безпекою проблем, тому що блокада PD-L1 залишає шліх PD-L2 – PD-1 інтактним, сприяючи периферійній аутотолерантності (Latchman Y, Wood CR, Chernova T, та інш. PD-L1 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol 2001;2(3):261-68).

У даний час Авелумаб тестують в клінічних умовах для різних типів злоякісних новоутворень, включаючи недрібноклітинний рак легенів, уротеліальну карциному, мезотеліому, карциному з клітин Меркеля, рак шлунку або гастроезофагеального сполучення, рак яєчників і рак молочної залози.

Амінокислотні послідовності Авелумабу і варіанти послідовностей і їх антигензв'язувальні фрагменти описані в WO2013079174, де антитіло, що має амінокислотну послідовність Авелумабу, позначено як A09-246-2. Також описані способи виготовлення і деякі застосування в медицині.

Інші застосування в медицині Авелумабу описані в WO 2016137985, WO2016181348, WO 2016205277, PCT/US 2016/053939, заявці на патент США серійний № 62/423,358.

У розділі 2.4 заявки WO 2013079174 також описаний водний склад людського антитіла з амінокислотною послідовністю Авелумабу. Цей склад містить антитіло в концентрації 10 мг/мл, метіонін як антиоксиданту і має pH 5,5. Склади Авелумабу, які не містять антиоксидант описані в PCT/EP2016/002040.

Дослідження складу для неглікозильованого антитіла проти PD-L1 типу IgG1 описано в WO2015048520, де для клінічних досліджень був вибраний склад з pH 5,8.

Опис винаходу

Оскільки Авелумаб зазвичай вводять пацієнту шляхом внутрішньовенної інфузії і, відповідно, його забезпечують у водній формі, то даний винахід відноситься до інших водних складів, які є придатними для стабілізації Авелумабу з його посттрансляційними модифікаціями,

і при більш високих концентраціях, у порівнянні з описаним у WO 2013079174.

На Фігурі 1a (SEQ ID NO:1) представлена повнорозмірна послідовність важкого ланцюга Авелумабу, як експресується клітинами CHO, які використовують як організм-хазяїн.

Тим не менше, часто спостерігають, що під час продукції антитіла С-кінцевий лізин (K) важкого ланцюга відщеплюється. Розташована в Fc-ділянці, ця модифікація не має впливу на зв'язування антитіла з антигеном. Тому в деяких варіантах здійснення С-кінцевий лізин (K) послідовності важкого ланцюга Авелумабу відсутній. Послідовність важкого ланцюга Авелумабу без С-кінцевого лізину представлена на Фігурі 1b (SEQ ID NO:2).

На Фігурі 2 (SEQ ID NO:3) представлена повнорозмірна послідовність легкого ланцюга Авелумабу.

Посттрансляційна модифікація з високою значущістю являє собою гликозилювання.

Більшість з розчинних і мембранно-зв'язаних білків, які виробляються в ендоплазматичному ретикулумі еукаріотичних клітин, піддаються глікозилюванню, при якому ферменти, які називають глікозилтрансферазами, приєднують одну або декілька цукрових одиниць до специфічних сайтів глікозилювання білків. Найбільш часто, точками приєднання є групи NH_2 або OH, що призводить до N-зв'язаного або O-зв'язаного глікозилювання.

Це також відноситься до білків, таких як антитіло, які продукуються рекомбінантно в еукариотичних клітинах-хазяях. Рекомбінантні антитіла IgG містять консервативний N-зв'язаний сайт глікозилювання на визначеному аспарагіновому залишку Fc-області в домені CH2. Існує багато відомих фізіологічних функцій N-зв'язаного глікозилювання в антитілі, таких як вплив на його розчинність і стабільність, резистентність до протеази, зв'язування з Fc-рецепторами, клітинний транспорт і циркулювальний період напіввиведення in vivo (Hamm M. та інш., Pharmaceuticals 2013, 6, 393-406). N-гліканові структури антитіла IgG являють собою переважно структури типу двохантенного комплексу, що містять одиниці b-D-N-ацетилглюкозаміну (GlcNac), манози (Man) і часто галактози (Gal) і фукози (Fuc).

В Авелумабі єдиним сайтом глікозилювання є Asn300, розташований в домені CH2 обох важких ланцюгів. Деталі стосовно глікозилювання описані в Прикладі 1.

Оскільки глікозилювання впливає на розчинність і стабільність антитіла, то раціонально приймати цей параметр до уваги при розробці стабільного, фармацевтично придатного складу антитіла.

Несподіваним чином винахідниками даної патентної заявки було виявлено, що можна стабілізувати Авелумаб, повністю охарактеризований його амінокислотною послідовністю і його посттрансляційними модифікаціями, в декількох водних складах без наявності антиоксиданту, при значеннях pH навіть нижче 5,2.

Фігури

Фігура 1a: Послідовність важкого ланцюга Авелумабу (SEQ ID NO:1)

Фігура 1b: Послідовність важкого ланцюга Авелумабу, в якій відсутній 3-кінцевий K (SEQ ID NO:2)

Фігура 2: Послідовність легкого ланцюга Авелумабу (SEQ ID NO:3)

Фігура 3: Вторинна структура Авелумабу

Фігура 4: 2AB РХГВ-НЕРХ Хроматограма Гліканів Авелумабу

Фігура 5: Нумерація піків Фігури 4

Визначення

Якщо не зазначено інше, наступні терміни, використовувані в описі й формулі винаходу, мають наступні значення, викладені нижче.

Посилання у даній заявці на "Авелумаб" охоплюють антитіло проти PD-L1 типу IgG1, як визначено в WO 2013079174 за допомогою його амінокислотної послідовності, і як визначено у даній патентній заявці за допомогою його амінокислотної послідовності і за допомогою його посттрансляційних модифікацій. Посилання у даній заявці на "Авелумаб" можуть охоплювати біологічні аналоги, які, наприклад, можуть складати щонайменше 75 %, відповідно щонайменше 80 %, переважно щонайменше 85 %, переважно щонайменше 90 %, переважно щонайменше 95 %, переважно щонайменше 96 %, переважно щонайменше 97 %, переважно щонайменше 98 % або найбільш переважно щонайменше 99 % ідентичності амінокислотної послідовності з амінокислотними послідовностями, описаними в WO 2013079174. Альтернативно або додатково, посилання у даній заявці на "Авелумаб" можуть охоплювати біологічні аналоги, які відрізняються посттрансляційними модифікаціями, зокрема характером глікозилювання, описаним у даній заявці.

Термін "біологічний аналог" (також відомий як біопрепарати) добре відомий у даній галузі техніки, і кваліфікований спеціаліст може легко визначити, коли речовини лікарського засобу буде розглядатися як біологічний аналог Авелумабу. Термін "біологічний аналог", як правило,

вживають для опису подальших версій (зазвичай з іншого джерела) "інноваційних біофармацевтичних продуктів" ("біопрепарати", лікарська речовина яких вироблена живим організмом або походить від живого організму, або за допомогою методик рекомбінантної ДНК або контрольованої експресії генів), на які раніше офіційно отримали реєстраційне посвідчення. Оскільки біопрепарати мають високий ступінь молекулярної складності й в цілому є чутливими до змін у процесах виготовлення (наприклад, якщо для їх одержання використовують різні клітинні лінії), і оскільки наступні виробники "другого ешелону", як правило, не мають доступу ні до молекулярного клону розробника, клітинного банку, ноу-хау відносно процесу ферментації й очищення, ні до самої активної речовини лікарського засобу (тільки до серійно виробленого розробниками лікарського продукту), то будь-який "біоаналог" малоймовірно буде точно таким самим, як оригінальний лікарський засіб.

У даній заявці термін "буфер" або "буферний розчин" відноситься зазвичай до водного розчину, що містить суміш кислоти (як правило, слабкої кислоти, наприклад, оцтової кислоти, лимонної кислоти, імідазолієвої форми гістидину) і її кон'югованої основи (наприклад, ацетатної або цитратної солі, наприклад, ацетат натрію, цитрат натрію або гістидин), або як альтернативний варіант суміш основи (як правило, слабкої основи, наприклад, гістидину) і його кон'югованої кислоти (наприклад, протонованої солі гістидину). Значення pH "буферного розчину" буде змінюватися дуже незначно при додаванні невеликої кількості сильної кислоти або основи завдяки "буферному ефекту", який забезпечує "буферний агент".

У даній заявці "буферна система" містить один або декілька буферних агентів і/або їх кон'югатів з кислотою або основою, і більш переважно містить один або декілька буферних агентів) і їх кон'югатів з кислотою або основою, і найбільш переважно містить тільки один буферний агент і його кон'югат з кислотою або основою. Якщо не зазначено інше, то будь-які концентрації, передбачені у даному винаході відносно "буферної системи" (тобто, концентрація буферу) переважно відноситься до комбінованої концентрації буферних агентів і/або їх кон'югатів з кислото. або основою. Іншими словами, концентрації, передбачені у даній заявці відносно "буферної системи", переважно відносяться до комбінованої концентрації всіх відповідних буферних речовин (тобто речовин в динамічній рівновазі одна з іншою, наприклад, цитрат/лимонна кислота). Як така, задана концентрація гістидинової буферної системи, як правило, відноситься до комбінованої концентрації гістидину і імідазолієвої форми гістидину. Тим не менше, у випадку гістидину, такі концентрації, як правило, легко розрахувати, виходячи з вхідних величин гістидину або його солі. Загальне значення pH композиції, що містить відповідну буферну систему, в основному, є відображенням рівноважної концентрації кожного з відповідних буферних речовин (тобто балансу буферного агенту(ів) до його кон'югату(ів) з кислотою або основою).

У даній заявці термін "буферний агент" відноситься до кислотного або лужного компонента (зазвичай слабкій кислоті або слабкій основі) буферу або буферного розчину. Буферний агент допомагає підтримувати значення pH даного розчину при або навколо заздалегідь визначеного значення, і буферні агенти зазвичай вибирають для доповнення заздалегідь визначеного значення. Переважно буферний агент являє собою єдину сполуку, яка призводить до бажаного буферного ефекту, зокрема, якщо зазначений буферний агент змішують з (і переважно здатний до протонного обміну з) відповідною кількістю (залежно від заздалегідь визначеного бажаного значення pH) його відповідного "кислотного/лужного кон'югата" або якщо потрібна кількість його відповідного "кислотного/лужного кон'югата" утворюється in situ – цього можна досягти шляхом додавання сильної кислоти або основи до досягнення потрібного значення pH. Наприклад, в буферній системі з ацетатом натрію, являє можливим починати насамперед з розчину ацетату натрію (лужний), який потім підкислюють за допомогою, наприклад, соляної кислоти, або до розчину оцтової кислоти (кислотний), додають гідроксид натрію або ацетат натрію до досягнення бажаного значення pH.

В основному, "стабілізатор" відноситься до компоненту, який полегшує підтримання структурної цілісності біофармацевтичного лікарського засобу, зокрема під час заморожування і/або ліофілізації, і/або зберігання (зокрема, коли піддається навантаженню). Цей стабілізувальний ефект може бути зумовлений різними причинами, хоча зазвичай такі стабілізатори можуть діяти як осмоліти, які пом'якшують денатурацію білка. Як використовують у даній заявці, стабілізатори можуть являти собою цукрові спирти (наприклад, інозит, сорбіт), дисахариди (наприклад, сахарозу, мальтозу), моносахариди (наприклад, декстрозу (D-глюкозу)), або форми амінокислоти лізин (наприклад, моногідрохлорид лізину, ацетат або моногідрат), або солі (наприклад, хлорид натрію).

Агенти, використовувані як буферні агенти, антиоксиданти або поверхнево-активні речовини згідно з винаходом, виключені із значення терміну "стабілізатори", як використовують у даній

заявці, навіть якщо вони можуть проявляти, серед іншого, стабілізувальну активність.

У даній заявці термін "поверхнево-активна речовина" відноситься до поверхнево-активного агента, переважно неіонної поверхнево-активної речовини. Приклади поверхнево-активних речовин, використовуваних у даній заявці, охоплюють полісорбат, наприклад, Полісорбат 80 (поліоксіетилен (80) сорбітан моноолеат, також відомий під торговельною маркою Tween 80); поліоксилова рицинова олія, така як рицинова олія поліоксил 35, одержана реакцією рицинової олії з етиленоксидом в молярному співвідношенні 1: 35, також відома під торговельною маркою Kolliphor ELP; або Kollidon 12PF або 17PF, які є низькомолекулярними повідонами (полівінілпіролідонами), відомими під номером CAS 9003-39-8 і що мають трохи різну молекулярну вагу (12PF: 2000-3000 г/моль, 17PF: 7000-11000 г/моль).

Агенти, використовувані як буферні агенти, антиоксиданти або стабілізатори згідно з винаходом виключені із значення терміну "поверхнево-активні речовини", як використовують у даній заявці, навіть якщо вони можуть проявляти, серед іншого, поверхнево-активну активність.

У даній заявці термін "стабільний", в цілому, відноситься до фізичної стабільності, і/або хімічної стабільності й/або біологічної стабільності компонента, типово активного або його композиції, під час консервування/зберігання.

У даній заявці термін "антиоксидант" відноситься до агента, здатного запобігати або знижувати окиснення біофармацевтичного лікарського засобу для стабілізації в складі. Антиоксиданти охоплюють поглиначі вільних радикалів (наприклад, аскорбінову кислоту, BHT, сульфіт натрію, п-амінобензойну кислоту, глутатіон або пропілгалат), хелатувальні агенти (наприклад, EDTA або лимонну кислоту) або агенти обриву ланцюга (наприклад, метіонін або N-ацетилцистеїн).

Агенти, використовувані як буферні агенти, стабілізатори або поверхнево-активні речовини згідно з винаходом, виключені зі значення терміну "антиоксиданти" як використовують у даній заявці, навіть якщо вони можуть проявляти, серед іншого, антиоксидантну активність.

"Розріджувач" являє собою агент, який встановлює баланс інгредієнтів у будь-якій рідкій фармацевтичній композиції, наприклад, щоб проценти за вагою загалом складали 100 %. У даній заявці, рідка фармацевтична композиція являє собою водну фармацевтичну композицію, так що "розріджувач", використовуваний у даній заявці являє собою воду, переважно воду для ін'єкцій (WFI).

У даній заявці термін "розмір частинок" або "розмір пор" відповідно відноситься до довжини найбільшого виміру даної частинки або пори. Обидва розміри можуть бути виміряні, використовуючи лазерний аналізатор розміру частинок і/або електронні мікроскопи (наприклад, тунельний електронний мікроскоп, TEM або сканувальний електронний мікроскоп, SEM). Кількість частинок (для будь-якого заданого розміру) може бути одержана із застосуванням протоколів і обладнання, викладених у Прикладах, яке відноситься до кількості частинок, яких не видно неозброєним оком.

У даній заявці термін "приблизно" відноситься до звичайних меж похибки для відповідного значення, добре відомих кваліфікованому спеціалісту у даній галузі техніки. Посилання на "приблизно" для значення або параметра у даній заявці охоплює (і описує) варіанти здійснення, які відносяться до значення або параметра per se. У випадку сумнівів або якщо у даній галузі техніки відсутнє загальноприйнятне розуміння відносно меж похибки для визначеного значення або параметра, "приблизно" означає ± 5 % від цього значення або параметра.

У даній заявці термін "процентна доля" у зв'язку з видами гліканів відноситься безпосередньо до числа різних видів. Наприклад, вираз "зазначений FA2G1 має долю 25 % - 41 % всіх видів гліканів" означає, що в 50 підданих аналізу молекулах антитіл, що мають 100 важких ланцюгів, 25-41 важких ланцюгів будуть проявляти профіль глікозилювання FA2G1.

Слід прийняти до уваги, що посилання на поняття "лікування" або "терапія" охоплюють профілактику, а також полегшення встановлених симптомів стану. Тому "лікування" або "терапія" статусу, порушення або стану охоплює: (1) запобігання або уповільнення появи клінічних симптомів статусу, порушення або стану, що розвивається у людини, яка може страждати або бути схильним до статусу, порушення або стану, але ще не відчуває або не проявляються клінічні або субклінічні симптоми статусу, порушення або стану, (2) інгібування статусу, порушення або стану, тобто інгібування статусу, порушення або стану, тобто зупинення, зменшення або уповільнення розвитку захворювання або його рецидиву (у випадку підтримувальної терапії) або щонайменше його одного клінічного або субклінічного симптому або (3) полегшення або послаблення захворювання, тобто викликаючи регрес статусу, викликаючи регрес або щонайменше одного з його клінічних або субклінічних симптомів.

Водний склад антитіла проти PD-L1

У першому аспекті у винаході запропонований новий водний фармацевтичний склад

антитіла, який містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до 30 мг/мл як антитіло;

(ii) гліцин, сукцинат, цитрат - фосфат або гістидин в концентрації від 5 мМ до 35 мМ як буферний агент;

(iii) моногідрохлорид лізину, моногідрат лізину, ацетат лізину, декстрозу, сахарозу, сорбіт або інозит в концентрації від 100 мМ до 320 мМ як стабілізатора;

(iv) повідон, поліоксилову рицинову олію або полісорбат в концентрації від 0,25 мг/мл до 0,75 мг/мл як поверхнево-активну речовину;

де склад не містить метіонін, і

причому додатково склад має pH від 3,8 до 5,2.

У переважному варіанті здійснення склад не містить жодного антиоксиданта.

В одному варіанті здійснення концентрація Авелумабу в зазначеному складі складає від приблизно 10 мг/мл до приблизно 20 мг/мл.

В ще одному варіанті здійснення концентрація гліцину, сукцинату, цитрат - фосфату або гістидину в зазначеному складі складає від приблизно 10 мМ до приблизно 20 мМ.

В інших варіантах здійснення в зазначеному складі концентрація монохлориду лізину складає від приблизно 140 мМ до приблизно 280 мМ, або концентрація зазначеного моногідрату лізину складає приблизно 280 мМ, або концентрація зазначеного ацетату лізину складає приблизно 140 мМ.

У ще одному варіанті здійснення концентрація декстрози, сахарози, сорбіту або інозиту в зазначеному складі складає приблизно 280 мМ.

У ще одному варіанті здійснення концентрація повідону, поліоксилової рицинової олії або полісорбату інозиту в зазначеному складі складає приблизно 0,5 мг/мл.

У переважному варіанті здійснення зазначений повідон в зазначеному складі являє собою низькомолекулярний полівінілпіролідон Kollidon 12PF або 17PF під номером CAS 9003-39-8.

В іншому переважному варіанті здійснення зазначена поліоксилова рицинова олія являє собою рицинову олію поліоксил 35. У ще одному переважному варіанті здійснення зазначений полісорбат являє собою Полісорбат 80.

У більш переважному варіанті здійснення новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) гліцин в концентрації від 5 мМ до 15 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу або сорбіт в концентрації від 100 мМ до 320 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) Kollidon 12PF, рицинову олію поліоксил 35 або Полісорбат 80 у концентрації від 0,25 мг/мл до 0,75 мг/мл, як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 3,8 до 4,6, і не містить антиоксидант.

У рівним чином переважному варіанті здійснення новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) сукцинат в концентрації от 5 мМ до 15 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу або сорбіт в концентрації від 100 мМ до 320 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) Kollidon 12PF або рицинову олію поліоксил 35 в концентрації від 0,25 мг/мл до 0,75 мг/мл, як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 4,9 до 5,2 і не містить антиоксидант.

У рівним чином переважному варіанті здійснення новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) цитрат - фосфат в концентрації від 10 мМ до 20 мМ як буферний агент і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу або сорбіт в концентрації від 100 мМ до 320 мМ як стабілізатора і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) Kollidon 12PF або рицинову олію поліоксил 35 в концентрації від 0,25 мг/мл до 0,75 мг/мл як поверхнево-активну речовину і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 3,8 до 4,7 і не містить антиоксидант.

У рівним чином переважному варіанті новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) гліцин в концентрації приблизно 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації приблизно 140 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації приблизно 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 4,2 до 4,6 і не містить антиоксидант.

У більш переважному варіанті здійснення, новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) гліцин в концентрації приблизно 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) ацетат лізину в концентрації приблизно 140 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації приблизно 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 4,2 до 4,6 і не містить антиоксидант.

У рівним чином переважному варіанті здійснення новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) гістидин в концентрації приблизно 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) сахарозу в концентрації приблизно 280 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) Kollidon 12PF в концентрації приблизно 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 4,8 до 5,2, і не містить антиоксидант.

У рівним чином переважному варіанті здійснення новий водний фармацевтичний склад антитіла містить:

(i) Авелумаб в концентрації від 1 мг/мл до приблизно 20 мг/мл як антитіло;

(ii) сукцинат в концентрації приблизно 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації приблизно 140 мМ як стабілізатора, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації приблизно 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад має pH від 4,8 до 5,2, і не містить антиоксидант.

У більш переважному варіанті здійснення описаних вище варіантів здійснення, концентрація Авелумабу складає приблизно 20 мг/мл.

У ще більш переважному варіанті здійснення зазначений склад охоплює в себе:

(i) Авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гліцин в концентрації 10 мМ;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду (для ін'єкцій) як розчинник;

і має pH 4,4 (± 0.1);

або

(i) Авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гліцин в концентрації 10 мМ;

(iii) ацетат лізину в концентрації 140 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду (для ін'єкцій) як розчинник;

і має pH 4,4 (± 0.1);

або

(i) Авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гістидин в концентрації 10 мМ;
(iii) сахарозу в концентрації 280 мМ;
(iv) Kollidon 12PF в концентрації 0,5 мг/мл;
(v) HCl або NaOH для регулювання pH;
(vi) воду (для ін'єкцій) як розчинник;
і має pH 5,0 (± 0,1);
або
(i) Авелумаб в концентрації 20 мг/мл;
(ii) сукцинат в концентрації 10 мМ;
(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ;
(iv) рицинову олію поліоксил 35 в концентрації 0,5 мг/мл;
(v) HCl або NaOH для регулювання pH;
(vi) воду (для ін'єкцій) як розчинник;
і має pH 5.0 (± 0.1).

В іншому переважному варіанті здійснення, склад має осмоляльність між 270 і 330 мОсм/кг.

В одному варіанті здійснення зазначений Авелумаб в описаних вище складах має послідовність важкого ланцюга або Фіг. 1a (SEQ ID NO:1) або Фіг. 1b (SEQ ID NO:2), послідовність легкого ланцюга Фіг. 2 (SEQ ID NO:3), і несе глікозилювання на Asn300, який містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають загальну долю > 70 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення, у глікозилюванні Авелумабу зазначений FA2 має долю 44 % - 54 % і зазначений FA2G1 має долю 25 % - 41 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення у глікозилюванні Авелумабу зазначений FA2 має долю 47 % - 52 % і зазначений FA2G1 має долю 29 % - 37 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення, у глікозилюванні Авелумабу зазначений FA2 має долю приблизно 49 % і зазначений FA2G1 має долю приблизно 30 % - приблизно 35 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення глікозилювання Авелумабу, крім того, як другорядного виду глікану містить A2 з долею < 5 %, A2G1 з долею < 5 %, A2G2 з долею в < 5 % і FA2G2 з долею < 7 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення, у глікозилюванні Авелумабу зазначений A2 має долю 3 %-5 %, зазначений A2G1 має долю < 4 %, зазначений A2G2 має долю < 3 %, а зазначений FA2G2 має долю 5 %-6 % всіх видів гліканів.

У переважному варіанті здійснення, у глікозилюванні Авелумабу зазначений A2 має долю приблизно 3,5 % - приблизно 4.5 %, зазначений A2G1 має долю приблизно 0,5 % - приблизно 3.5 %, зазначений A2G2 має долю < 2.5 % і зазначений FA2G2 має долю приблизно 5.5 % всіх видів гліканів.

В одному варіанті здійснення зазначений Авелумаб в описаному вище складі має послідовність важкого ланцюга з Фіг. 1b (SEQ ID NO:2).

В одному варіанті здійснення описаний вище склад Авелумабу призначений для внутрішньовенного введення (в.в.).

Пристрій для доставки лікарського засобу

У другому аспекті в даному винаході запропонований пристрій для доставки лікарського засобу, який містить рідку фармацевтичну композицію, як описано у даній заявці. Переважно пристрій для доставки лікарського засобу містить камеру, в якій зберігається фармацевтична композиція. Переважно пристрій для доставки лікарського засобу є стерильним.

Пристрій для доставки лікарського засобу може являти собою флакон, ампулу, шприц, ін'єкційну ручку (наприклад, яка по суті містить шприц), або в/в (внутрішньовенний) контейнер.

Водні фармацевтичні склади вводять парентерально, переважно шляхом підшкірної ін'єкції, внутрішньом'язової ін'єкції, в/в ін'єкції або в/в інфузії. Найбільш переважним шляхом введення є в/в інфузія.

У переважному варіанті здійснення пристрій для доставки лікарського засобу являє собою флакон, що містить описаний вище склад.

У більш переважному варіанті здійснення зазначений флакон містить 200 мг Авелумабу в 10 мл розчину для концентрації 20 мг/мл.

У ще більш переважному варіанті здійснення флакон являє собою скляний флакон.

Медичне лікування

У третьому аспекті у винаході запропонований спосіб лікування раку, що охоплює у себе введення описаного вище складу пацієнту.

В одному варіанті здійснення рак, що підлягає лікуванню вибирають із недрібноклітинного

раку легенів, уротеліальної карциноми, раку сечового міхура, мезотеліоми, карциноми з клітин Меркеля, раку шлунку або гастроезофагеального сполучення, раку яєчників, раку молочної залози, тимоми, аденокарциноми шлунку, адренокортикальної карциноми, плоскоклітинного раку голови і шиї, нирково-клітинної карциноми, меланоми і/або класичної лімфоми Ходжкіна.

Способи виготовлення

Також у даному винаході запропонований спосіб виготовлення водного фармацевтичного складу, описаного у даній заявці. Переважно спосіб охоплює в себе сумісне змішування, у будь-якому конкретному порядку, який вважають доцільним, будь-яких відповідних компонентів, необхідних для утворення водного фармацевтичного складу. Спеціаліст у даній галузі техніки може посилатися на приклади або методики, добре відомі з рівня техніки для утворення водних фармацевтичних складів (зокрема призначених для ін'єкцій за допомогою шприца або в/в інфузії).

Спосіб може охоплювати в себе спочатку приготування попередньої суміші (або попереднього розчину) з деяких або всіх компонентів (за вибором з деяким або всім розріджувачем), за виключенням Авелумабу, а потім і сам Авелумаб (за вибором з або попередньо розчиненим у деякій кількості розріджувача) можна змішати з попередньою сумішшю (або попереднім розчином) для одержання водного фармацевтичного складу або композиції, до якого/якої потім додають кінцеві компоненти, щоб одержати кінцевий водний фармацевтичний склад. Переважно, спосіб охоплює утворення буферної системи, переважно буферної системи, яка містить буферний агент, як описано у даній заявці. Буферна система переважно утворюється у попередній суміші перед додаванням Авелумабу. Буферна система може бути утворена шляхом простого змішування буферного агента (є у продажі готовим до застосування) з його кислотним/лужним кон'югатом (переважно у відповідних відносних кількостях для забезпечення бажаного pH – це може бути визначено кваліфікованим спеціалістом або теоретично, або експериментально). У випадку ацетатної буферної системи це означає, наприклад, змішування ацетату натрію з HCl, або змішування оцтової кислоти з NaOH або ацетатом. Значення pH будь-якої попередньої суміші кінцевого водного фармацевтичного складу може бути доцільно відрегульовано шляхом додавання потрібної кількості основи або кислоти, або кількості буферного агента або кислотного/лужного кон'югата.

У деяких варіантах здійснення буферний агент і/або буферну систему попередньо утворюють у вигляді окремої суміші й буферну систему переносять до попередника водного фармацевтичного складу (який містить деякі або всі компоненти, не враховуючи буферний агент і/або буферну систему, які переважно містять Авелумаб і потенційно тільки Авелумаб) за допомогою заміни буферу (наприклад, використовуючи діафільтрацію до досягнення відповідних концентрацій або осмолярності). Після цього, при необхідності, можуть бути додані інші наповнювачі, щоб одержати кінцеву рідку фармацевтичну композицію. Значення pH може бути відрегульовано один раз або до того, як будуть присутні всі компоненти.

Перед змішуванням з іншими компонентами будь-який, деякі або всі компоненти можуть бути попередньо розчинені або попередньо змішані з розріджувачем.

Кінцевий водний фармацевтичний склад можна відфільтрувати, переважно для видалення завислих частинок. Переважно фільтрацію здійснюють через фільтри розміром в або менше 1 мкм, переважно в 0,22 мкм. Переважно фільтрацію здійснюють за допомогою фільтрів PES або фільтрів PVDF, переважно за допомогою 0,22 мкм фільтрів PES.

Спеціалісту у даній галузі техніки добре відомо, можна використовувати водний фармацевтичний склад для приготування в/в розчину, щоб лікарську речовину на основі антитіл можна було вводити внутрішньовенно.

Приготування в/в розчину зазвичай охоплює в себе певну кількість розчину, яка була відібрана з контейнерів з фізіологічним розчином (наприклад, 0,9 % або 0,45 % фізіологічним розчином) за допомогою пластикового шприца (PP) і голки, і замінено водним фармацевтичним складом. Замінювана кількість розчину буде залежати від маси тіла пацієнтів.

Скорочення

ANOVA	Дисперсійний аналіз
CD	круговий дихроїзм
CE - SDS	капілярний електрофорез в присутностідецилсульфату натрію о
cIEF	капілярне ізоелектрофокусування
DoE	план експерименту
DP	лікарський продукт

DS	лікарська речовина
FT	заморожування - відтаювання
HMW	висока молекулярна вага
LMW	низька молекулярна вага
SE - HPLC	ексклюзійна високоефективна рідинна хроматографія
ОГ	оптична густина
PES	поліефірсульфон
PVDF	полівініліденфторид
ВВ відносна вологість	
SE - HPLC	ексклюзійна високоефективна рідинна хроматографія
UV	ультрафіолет
WFI	вода для ін'єкцій

Приклади

Приклад 1 – Структура Авелумабу

1.1 Первинна структура

Авелумаб являє собою IgG молекули з двома важкими і двома легкими ланцюгами. Амінокислотні послідовності двох ланцюгів представлені на Фігурах 1a (SEQ ID NO:1) / 1b (SEQ ID NO:2) і відповідно 2 (SEQ ID NO:3).

1.2 Вторинна структура

Методи ЖХ-МС і МС/МС використовували для підтвердження інтактних ланцюгів молекули і присутності посттрансляційних модифікацій білків. Вторинна структура субодиниць молекули Авелумабу представлені на Фігурі 3.

Як підтверджено за допомогою UPLC-Q-TOF мас-спектрометрії пептидів, одержаних шляхом розщеплення трипсином, дисульфідні зв'язки Cys21-Cys96,Cys21-Cys90, Cys147-Cys203, Cys138-Cys197, Cys215-Cys223, Cys229-Cys229, Cys232-Cys232, Cys264-Cys324 і Cys370-Cys428 утворюють дев'ять типових IgG моделей зв'язування.

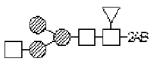
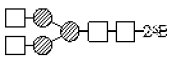
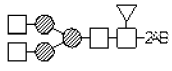
1.3 Глікозилювання

Молекула містить один сайт N-глікозилювання на Asn300 важкого ланцюга. Як визначено за допомогою картування пептиду, основна структура, ідентифікована шляхом MALDI-TOF, представляла собою складний фукозильований олігосахарид з ядром двохантенного типу з нульовим (G0F), одним (G1F) або двома остатками галактози (G2F). Основними видами є G0F і G1F.

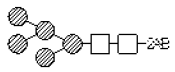
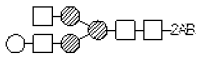
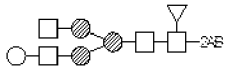
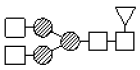
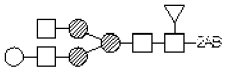
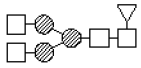
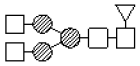
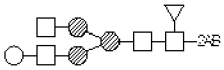
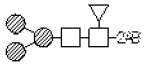
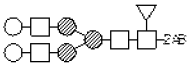
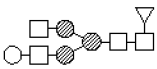
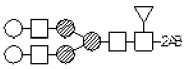
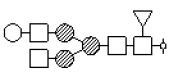
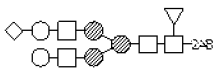
Глікани Авелумабу, флуоресцентно мічені за допомогою 2-аминобензаміду, аналізували за допомогою HILIC-UPLC-ESI-Q-TOF. На Фігурі 4 показаний профіль UPLC виявлених видів гліканів.

Таблиця 1

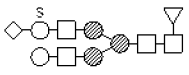
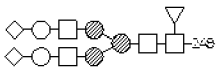
Ідентифікація піку хроматограми 2AB HILIC-UPLC

Пік	Чу(хв)	Виміряна МВ	Очікувана МВ	Ідентифікація	Оксфорд-ська номенкла-тура	Ідентифікація шляхом
1a	5,99	1380,52 (M+H)	1380,54 (M+H)		FA1	Вручну ідентифікований шляхом МС
2	6,01	1437,54	1437,56		A2	Вручну ідентифікований шляхом МС
3	7,02	1583,74 (M+H)	1583,62 (M+H)		FA2	МС в джерелі фрагментації шляхом GlycoworkBench

Таблиця 1 (продовження)

Пік	Чу(хв)	Виміряна МВ	Очікувана МВ	Ідентифікація	Оксфордська номенклатура	Ідентифікація шляхом
4	7,77	1355,57 (M+H)	1355,51 (M+H)		M5	Вручну ідентифікований шляхом МС
5	8,16	1599,77 (M+H)	1599,62 (M+H)		A2G1	Вручну ідентифікований шляхом МС
6	9,82	1744,79	1744,67		FA2G1	МС в джерелі фрагментації шляхом GlycoworkBench
		1462,90	1462,54		FA2 вільний кінець	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
7	10,07	1744,80	1744,67		FA2G1	МС в джерелі фрагментації шляхом GlycoworkBench
		1462,91	1462,54		FA2 вільний кінець	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
8	10,44	1462,90	1462,54		FA 2 вільний кінець	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
		1744,79	1744,67		FA2G1	Вручну ідентифікований шляхом МС
9	12,15	1177,50 (M+H)	1177,46 (M+H)		FM3	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
10	16,66	Відсутня іонізація	Відсутня іонізація			
11	13,42	1906,33	1906,72		FA2G2	МС в джерелі фрагментації шляхом GlycoworkBench
		1624,71	1624,59		FA2G1 вільний кінець	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
12	13,71	954,40 (M+2H)/2	954,36 (M+2H)/2		FA2G2	Вручну ідентифікований шляхом МС
		1626,69	1626,61		FA2G1 червоний кінець	GlycoworkBench ідентифікований шляхом МС
13	17,46	1099,97 (M+2H)/2	1099,91 (M+2H)/2		FA2G2S	МС в джерелі фрагментації шляхом GlycoworkBench

Таблиця 1 (продовження)

Пік	Чу(хв)	Виміряна МВ	Очікувана МВ	Ідентифікація	Оксфордська номенклатура	Ідентифікація шляхом
14	18,54	1079,91 (M+2HJ/2	1079,86 (M+2H)/2		FA2G2S вільний кінець+S (можливо-невеликі сліди)	Вручну ідентифікований шляхом МС
15	21,04	2489,05	2488,91		FA2G2S2	Вручну ідентифікований шляхом МС

Геометричні форми, що представляють гліканові зв'язувальні блоки, відповідають наступним молекулярним структурам:



Man: маноза, Fuc: фукоза, Gal: галактоза, GalNAc: N-Ацетилгалактозамін, NANA: сіалова кислота

Використовувана номенклатура гліканів відповідає Оксфордському позначенню, як запропоновано у Harvey та інш. (Proteomics 2009, 9, 3796-3801). У видах, що містять фукозу (FA2, FA2G1, FA2G2), зв'язність Fuc-GlcNAc являє собою α1-6. У видах, що мають кінцевий GlcNAc, зв'язність GlcNAc-Man являє собою β1-2. У видах, що мають галактозу зв'язність Gal-GlcNAc являє собою β1-4.

Описаний хроматографічний профіль був інтегрований і дав розподіл видів гліканів Авелумабу, як показано в Таблиці 2a.

Таблиця 2a

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2	M5**
3.6	48.7	3.4	35.6	2.3	5.4	1.0

** Ймовірно Маноза 5, сумісна елюція з двохантенними моно-галактозильованими видами

Аналіз картування гліканів підтвердив ідентифікацію, здійснену шляхом картування пептидів (що дозволяє ідентифікувати два основних види гліканів), додатково до вторинних і другорядних видів, які також були охарактеризовані за допомогою цього метода, специфічного для аналізу гліканів.

В іншому вимірюванні спостерігали розподіл наступних видів гліканів.

Таблиця 2b

A2	FA2	A2G1	FA2G1	A2G2	FA2G2
4.0	50.2	1.0	30.0	0.1	5.6

Приклад 2 – скринінг DoE

Скринінг плану експерименту при 20 мг/мл Авелумабу оцінював вплив декількох факторів, таких як зміна типу буферу/pH, стабілізаторів, типу поверхнево-активної речовини і відповідної концентрації. Дослідження, в якому тестували 80 різних складів, призвело до вибору прийнятних умов, у яких можна максимізувати стабільність білка.

У цьому DoE були досліджені чотири різних буферу, що охоплюють різні типи буферів і ефективний діапазон буферизації pH:

Амінокислотні буфери, такі як Гліцин (ефективний pH від 4,0 до 7,5) і Гістидин (ефективний pH від 5,0 до 6,6).

Хелатний іонний буфер, такий як Цитрат (ефективний pH від 4,0 до 7,5).

Сукцинат (ефективне pH від 5,0 до 6,0).

Сім стабілізаторів були вибрані в DoE на основі їх хімічної структури. В DoE були включені цукри, поліоли, солі й амінокислоти. Розбиття має наступний вигляд:

Цукри: були вибрані дисахариди цукроза і мальтоза, а також моносахарид декстроза (D-глюкоза).

Цукрові спирти: для DoE були вибрані два цукрових спирти/поліоли - сорбіт і інозит.

Сіль: Хлорид натрію був досліджений як автономний стабілізатор в цьому DoE.

Амінокислота: Лізин, була досліджена позитивно заряджена амінокислота.

В таблиці 3 наведені зразки і їх відповідні композиції.

Таблиця 3

Скринінг DoE складів

ІД зразку	pH	Буфер	Буферна сила (мМ)	Стабілізатор (280 мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)
1	4	Цитрат-фосфат	10	Сорбіт	Kollidon 12PF
2	4	Цитрат-фосфат	50	Декстроза	Tween 40
3	4.5	Цитрат-фосфат	20	Декстроза	Tween 40
4	4.5	Цитрат-фосфат	30	Інозит	Kollidon 12PF
5	4.8	Цитрат-фосфат	40	Мальтоза	Kolliphor ELP
6	4.8	Цитрат-фосфат	40	Лізин	Tween 80
7	5.2	Цитрат-фосфат	50	Декстроза	Kolliphor ELP
8	5.2	Цитрат-фосфат	10	Хлорид натрію	Tween 80
9	5.2	Цитрат-фосфат	20	Лізин	Kolliphor ELP
10	5.5	Цитрат-фосфат	20	Цукроза	Kollidon 12PF
11	5.5	Цитрат-фосфат	30	Лізин	Tween 40
12	6	Цитрат-фосфат	20	Мальтоза	Tween 40
13	6	Цитрат-фосфат	30	Хлорид натрію	Kolliphor ELP
14	6.5	Цитрат-фосфат	30	Декстроза	Tween 80
15	6.5	Цитрат-фосфат	30	Сорбіт	Tween 80
16	7	Цитрат-фосфат	50	Цукроза	Tween 80
17	7	Цитрат-фосфат	10	Лізин	Kollidon 12PF
18	7	Цитрат-фосфат	10	Інозит	Tween 80
19	7	Цитрат-фосфат	30	Хлорид натрію	Tween 40
20	7.5	Цитрат-фосфат	50	Інозит	Kolliphor ELP
21	7.5	Цитрат-фосфат	50	Сорбіт	Tween 40
22	4	Гліцин	10	Хлорид натрію	Kollidon 12PF
23	4	Гліцин	10	Декстроза	Tween 40
24	4	Гліцин	30	Сорбіт	Tween 40
25	4.3	Гліцин	50	Сорбіт	Kolliphor ELP
26	4.3	Гліцин	50	Інозит	Tween 40
27	4.3	Гліцин	50	Декстроза	Tween 80
28	4.5	Гліцин	30	Хлорид натрію	Tween 40
29	4.8	Гліцин	40	Лізин	Tween 80
30	4.8	Гліцин	40	Мальтоза	Tween 80
31	5.8	Гліцин	50	Лізин	Kollidon 12PF
32	5.8	Гліцин	30	Мальтоза	Kollidon 12PF
33	6	Гліцин	30	Цукроза	Kolliphor ELP
34	6.5	Гліцин	30	Хлорид натрію	Tween 80
35	6.8	Гліцин	40	Декстроза	Kolliphor ELP
36	6.8	Гліцин	10	Інозит	Tween 80
37	6.8	Гліцин	10	Сорбіт	Kollidon 12PF
38	7	Гліцин	10	Лізин	Kolliphor ELP
39	7	Гліцин	10	Інозит	Tween 40
40	7	Гліцин	30	Хлорид натрію	Tween 80
41	7.5	Гліцин	30	Інозит	Kolliphor ELP

Таблиця 3 (продовження)

ІД зразку	pH	Буфер	Буферна сила (мМ)	Стабілізатор (280 мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)
42	7.5	Гліцин	50	Декстроза	Kollidon 12PF
43	7.5	Гліцин	10	Цукроза	Kollidon 12PF
44	5	Гістидин	10	Мальтоза	Kolliphor ELP
45	5	Гістидин	10	Сорбіт	Kolliphor ELP
46	5	Гістидин	20	Декстроза	Kollidon 12PF
47	5.2	Гістидин	50	Інозит	Kolliphor ELP
48	5.2	Гістидин	50	Мальтоза	Kolliphor ELP
49	5.2	Гістидин	10	Мальтоза	Kollidon 12PF
50	5.5	Гістидин	50	Мальтоза	Tween 40
51	5.5	Гістидин	20	Хлорид натрію	Tween 40
52	5.8	Гістидин	10	Інозит	Kollidon 12PF
53	5.8	Гістидин	10	Інозит	Tween 80
54	5.8	Гістидин	50	Лізин	Kolliphor ELP
55	6	Гістидин	50	Хлорид натрію	Tween 80
56	6	Гістидин	10	Цукроза	Kolliphor ELP
57	6	Гістидин	10	Сорбіт	Tween 40
58	6	Гістидин	30	Хлорид натрію	Kollidon 12PF
59	6.5	Гістидин	40	Сорбіт	Kollidon 12PF
60	6.5	Гістидин	40	Мальтоза	Tween 80
61	6.5	Гістидин	50	Цукроза	Kollidon 12PF
62	6.5	Гістидин	50	Декстроза	Tween 40
63	6.6	Гістидин	30	Лізин	Tween 80
64	5	Сукцинат	50	Інозит	Kollidon 12PF
65	5	Сукцинат	10	Мальтоза	Kollidon 12PF
66	5	Сукцинат	50	Хлорид натрію	Tween 80
67	5.2	Сукцинат	30	Хлорид натрію	Tween 40
68	5.2	Сукцинат	50	Лізин	Kolliphor ELP
69	5.2	Сукцинат	50	Декстроза	Kollidon 12PF
70	5.4	Сукцинат	10	Мальтоза	Tween 80
71	5.4	Сукцинат	30	Інозит	Tween 40
72	5.4	Сукцинат	10	Декстроза	Tween 40
73	5.5	Сукцинат	30	Хлорид натрію	Kollidon 12PF
74	5.5	Сукцинат	30	Сахароза	Kollidon 12PF
75	5.5	Сукцинат	40	Декстроза	Tween 80
76	5.8	Сукцинат	10	Лізин	Tween 40
77	5.8	Сукцинат	20	Інозит	Kolliphor ELP
78	5.8	Сукцинат	50	Цукроза	Kolliphor ELP
79	6	Сукцинат	30	Сорбіт	Tween 80
80	6	Сукцинат	50	Хлорид натрію	Tween 40

В таблиці 4 перераховані проведені аналітичні тести (короткочасна стабільність, механічне навантаження, вплив світла, F/T) в рамках цього DoE скринінгу і представлені у даній заявці.

Таблиця 4

Панель аналізів, проведених на скринінгових складах DoE

Аналіз	Початок відліку	Вивчення стабільності (4 тижні при 40±2 °C 75 %ВВ)	Вплив світла	Механічне навантаження	Випробування на заморожування і відтаювання
Вміст білка за ОГ	X	-	-	-	-
Агрегація за оптичною густиною	X	X	X	X	X
Візуальний огляд	X	X	X	X	X
Фрагменти LMW за допомогою Bioanalyzer [1] (NR)	X	X	-	X	-
LMW і HMW за допомогою CE-SDS (NR)	X	-	X	-	-
HMW за допомогою SE-HPLC	X	X	X	X	X
Ізоформи за допомогою cIEF	X	-	X	-	-

(1) Bioanalyzer 2100 (Agilent)

2.1 Способи, використовувані для визначення стабільності

Термічна стабільність

Термічну стабільність складів досліджували після чотирьох тижнів зберігання при 40±2 °C (75 % в.в.) стосовно наступного:

Індекс агрегації: розраховують за оптичною густиною для відслідковування агрегації і утворення HMW домішок

Візуальний огляд на наявність видимих частинок

Вміст HMW по SE – HPLC (для відслідковування агрегації)

Вміст LMW за допомогою біоаналізатора (для відслідковування фрагментації)

Вплив світловим випроміненням

Склади піддавали впливу світловим випроміненням протягом 7 годин з інтенсивністю 765 Вт/м^2, що задовольняє вимоги директиви ICHQ1B. Склади були проаналізовані за допомогою наступних методів:

Індекс агрегації: розраховують за ОГ, вимірює ступінь утворення агрегатів, що виникає в результаті впливу світловим випроміненням

Візуальний огляд: на наявність видимих частинок в результате агрегації

CE-SDS: для виготовлення домішок LMW, які також вказують на HMW домішки

SE-HPLC: кількісне визначення HMW домішок, що утворюються в результаті агрегації

cIEF: дає представлення про відносну кількість варіантів заряду, може контролювати окислення (за продуктом від світлового впливу)

Механічне навантаження

Механічне (струшувальне) навантаження часто пов'язане з утворенням агрегатів через самоасоціацію білка і взаємодії між гідрофобними ділянками білка в розчині. Склади DoE у цьому дослідженні були перевірені на стійкість до вібрації після 24 годин перемішування при 200 об./хв. при кімнатній температурі. Склади зі струшувальним навантаженням аналізували наступним чином:

Індекс агрегації: розраховують за оптичною густиною для відслідковування агрегації і утворення HMW домішок.

Візуальний огляд на наявність видимих частинок

Вміст HMW за допомогою SE-HPLC (для відслідковування утворення HMW домішок і, відповідно, для моніторингу агрегації)

Вміст LMW за допомогою біоаналізаторів (для відслідковування фрагментації)

Випробування на заморожування і відтаювання

У міру того, як білковий склад замерзає, поверхня розділу утворюється, коли в розчині починають твердіти мікрообласті. У цих мікросередовищах відбувається зміна полярності, оскільки різні компоненти буферу для складу виключаються або включаються з рідкої матриці, яка твердіє. В результаті відбувається осадження білка внаслідок впливу гідрофільних/гідрофобних взаємодій на молекули в цих змінюваних мікросередовищах. Щоб

встановити ефективність різних стабілізаторів і поверхнево-активних речовин в DoE, зразки піддавали трьом циклам заморожування-відтаювання. Потім зразки були досліджені за допомогою наступних аналізів для визначення їх стійкості до осадження/агрегації/деградації при заморожуванні-відтаюванні:

Індекс агрегації: розраховують за оптичною густиною для відслідковування агрегації і утворення HMW домішок

Візуальний огляд на наявність видимих частинок

Вміст HMW за допомогою SE-HPLC (для відслідковування утворення HMW домішок і, відповідно, для моніторингу агрегації)

2.2 Виготовлення

Матеріал лікарської речовини композиції: 20,6 мг/мл Авелумаб, 51 мг/мл D-маніту, 0.6 мг/мл льодяної оцтової кислоти, pH 5.2 (без поверхнево-активної речовини врівноважували фільтрацією в тангенціальному потоці (з використанням Pellicon XL Cassette Biomax з відсіканням 10 кДа в PES) у трьох буферах:

10 мМ Цитрат – фосфат pH 5.2,

10 мМ Гліцин pH 5.2,

10 мМ Гістидин pH 5.2,

10 мМ Сукцинат pH 5.2.

Заміну буферу здійснювали з 5-кратним розведенням зазначеного вище DS в одному з чотирьох відповідних буферів і врівноваженням/концентруванням до одержання начального об'єму. Операція була повторена три рази. Чотири врівноважених матеріали лікарської речовини були досліджені на вміст білка за ОГ перед виготовленням складів.

Склади 1-21 (в цитрат - фосфатному буфері)

Обмінний матеріал DS (26.4 мг/мл) зважували у скляній склянці (30.30 грамів). При необхідності силу буферу коректували (початкова молярність обмінного DS: 10 мМ; діапазон молярності в формулах DoE: 10 – 50 мМ) шляхом додавання дигідрату гідрофосфату динатрію і моногідрату лимонної кислоти. Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали стабілізатор: сорбіт (2.04 г) або декстрозу (2.02 г) або інозит (2.02 г) або моногідрат мальтози (4.04 г) або моногідрохлорид лізину (2.02 г) або хлорид натрію (0.327 г) або сахарозу (3.83 г). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,4 мл 50 мг/мл розчину Tween 40 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 80 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP або 20 мг Kollidon 12PF (маточний розчин не потрібний). Розчин перемішували до повного розчинення. PH вимірювали і доводили до цільового значення розведеною о-фосфорною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (40 г) за допомогою відповідного буферу.

Склади 22-31 (в гліциновому буфері)

Обмінний матеріал DS (24.5 мг/мл) зважували у скляній склянці (32.65 г). При необхідності силу буферу коректували (початкова молярність обмінного DS: 10 мМ; діапазон молярності в формулах DoE: 10 – 50 мМ) шляхом додавання гліцину. Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали стабілізатор: сорбіт (2.04 г) або декстрозу (2.02 г) або інозит (2.02 г) або моногідрат мальтози (4.04 г) або моногідрохлорид лізину (2.02 г) або хлорид натрію (0.327 г) або сахарозу (3.83 г). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 40 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 80 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP або 20 мг Kollidon 12PF (маточний розчин не потрібний). Розчин перемішували до повного розчинення. PH вимірювали і доводили до цільового значення розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (40 г) за допомогою відповідного буферу.

Склади 32-43 (в гліциновому буфері)

Обмінний матеріал DS (23.2 мг/мл) зважували у скляній склянці (34.48 г). При необхідності силу буферу коректували (початкова молярність обмінного DS: 10 мМ; діапазон молярності в формулах DoE: 10 – 50 мМ) шляхом додавання гліцину. Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали стабілізатор: сорбіт (2.04 г) або декстрозу (2.02 г) або інозит (2.02 г) або моногідрат мальтози (4.04 г) або моногідрохлорид лізину (2.02 г) або хлорид натрію (0.327 г) або сахарозу (3.83 г). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 40 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 80 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP або 20 мг Kollidon 12PF (маточний розчин не потрібний). Розчин перемішували до повного розчинення. PH вимірювали і доводили до цільового значення розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (40 г) за допомогою відповідного буферу.

Склади 64-80 (у бурштиновому буфері)

Обмінний матеріал DS (22.5 мг/мл) зважували у скляній склянці (35.55 грамів). При необхідності силу буферу коректували (початкова молярність обмінного DS: 10 мМ; діапазон молярності в формулах DoE: 10 – 50 мМ) шляхом додавання бурштинової кислоти. Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали стабілізатор: сорбіт (2.04 г) або декстрозу (2.02 г) або інозит (2.02 г) або моногідрат мальтози (4.04 г) або моногідрохлорид лізину (2.02 г) або хлорид натрію (0.327 г) або сахарозу (3.83 г). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 40 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 80 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP або 20 мг Kollidon 12PF (маточний розчин не потрібний). Розчин перемішували до повного розчинення. РН вимірювали і доводили до цільового значення розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (40 грамів) за допомогою відповідного буферу.

Склади 44-63 (в гістидиновому буфері)

Обмінний матеріал DS (24.4 мг/мл) зважували у скляній склянці (32.80 г). При необхідності силу буферу коректували (початкова молярність обмінного DS: 10 мМ; діапазон молярності в формулах DoE: 10 – 50 мМ) шляхом додавання гістидину. Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали стабілізатор: сорбіт (2.04 г) або декстрозу (2.02 г) або інозит (2.02 г) або моногідрат мальтози (4.04 г) або моногідрохлорид лізину (2.02 г) або хлорид натрію (0.327 г) або сахарозу (3.83 г). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 40 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Tween 80 або 0,4 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP або 20 мг Kollidon 12PF (маточний розчин не потрібний). Розчин перемішували до повного розчинення. РН вимірювали і доводили до цільового значення розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (40 грамів) за допомогою відповідного буферу.

Фільтрація і наповнення

Кожний склад фільтрували через фільтр 0,22 мкм, зібраний на шприці об'ємом 50 мл (використовували мембрану Millex GP 0,22 мкм Express PES або мембрану Millex GV 0.22 мкм Durapore PVDF). Потім відфільтрований розчин заповнювали у відповідний контейнер (2 мл/контейнер).

2.3 Результати

Перевірка вмісту білка за ОГ при виготовленні

Вміст білка визначали за ОГ в момент часу 0 (при виготовленні). Були виявлені значення відповідно до очікуваної мети (20 мг/мл).

2.3.1 Термічне навантаження

Індекс агрегації за ОГ

Додаткова інформація про індекс агрегації як інструмент виявлення невидимих неозброєним оком частинок/більш великих агрегатів, які не виявляються за допомогою SE-HPLC, представлена в розділі Додаток.

Було виявлено, що гістидиновий буфер зазвичай асоціюється з більш високим збільшенням індексу агрегації при навантаженні (тобто з більшим збільшенням частинок), найбільш значно при підвищенні pH з 5,0 до 6,6 (pH-залежний ефект).

В інших буферах зміни в індексі агрегації, як правило, нижче, що вказує на менше збільшення невидимих неозброєним оком частинок.

Збільшення індексу агрегації, спостережуване у деяких (декількох) зразках, складених в цитрат-фосфатному і гліциновому буфері, напряму не пов'язано з конкретним фактором (наприклад, типом стабілізатора або поверхнево-активної речовини).

Дані були статистично оцінені за допомогою ANOVA для лінійної моделі поверхні відгуку, яка дала наступний результат:

Статистично значущий вплив типу буферу, сили і pH (всі мають значення $p < 0,001$): для мінімізації індексу агрегації повинні бути спрямовані низькі концентрації буферу (10 мМ), у зв'язку з низькими діапазонами pH в цитрат - фосфаті (4.0 – 5.0) і гліцині (4.0 – 5.8) і сукцинаті (5.0 – 5.5), у той час як гістидин, як правило, визначає негативний вплив на утворення частинок/більш великих агрегатів, яких не видно неозброєним оком.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE-HPLC

Кількість агрегатів (HMW) визначали за допомогою SE – HPLC у момент часу 0 і під термічним навантаженням. Цитрат – фосфат, як правило, призводить до більш високої агрегації, ніж еталонна формула (еталонний поріг виділений червоною горизонтальною смужкою на діаграмі), особливо при підвищенні pH. В гліциновому буфері переважними є низькі діапазони pH (нижче 5.0), тому що більш високі значення pH пов'язані з більш високою агрегацією (аналогічно використанню цитратного буферу). Сукцинат зазвичай призводить до

більш високих значень агрегації, ніж еталонний, при всіх умовах, у той час як гістидиновий буфер при низькому pH (5.0 – 5.5) ймовірно, забезпечує значення агрегації, порівняні з еталонними.

Дані також були статистично оцінені за допомогою ANOVA для лінійної моделі поверхні відгуку, і було підтверджено, що тип буферу є значущим фактором (p-значення = 0,02).

В цілому, щоб зменшити агрегати при термічному навантаженні, цитрат – фосфат (діапазон pH 4,0 – 5,0), гліцин (діапазон pH 4,.0 – 6,8) і гістидин (діапазон pH 5,0 – 5.,8) повинні бути більш переважними за сукцинатний буфер.

Комбінації, подібні до тих, які присутні в складах № 2 (Tween 40 + декстроза в цитрат - фосфатному буфері pH 4.0), склад № 22 (Kollidon 12PF + хлорид натрію в гліциновому буфері pH 4.0) і склад № 28 (Tween 40 + хлорид натрію в гліциновому буфері pH 4,5) ймовірно, є несприятливими для стабілізації білка (значне збільшення агрегації, не дивлячись на застосовні оптимальні умови pH/буфер) можливо через несумісність Kollidon 12PF і Tween 40 з низьким pH (приблизно 4,0 – 4,5)/взаємодії зі специфічними стабілізаторами, такими як хлорид натрію.

Фрагменти за допомогою Bioanalyzer

Рівні фрагментації оцінювали за допомогою Bioanalyzer. Хоча ніякі статистично значущі результати не могли бути виділені шляхом оцінки ANOVA, можна виділити умови, які є найбільш ефективними для мінімізації фрагментації, що забезпечують процентне співвідношення LMW відповідно еталонної композиції:

Цитрат – фосфатний буфер в діапазоні pH 4,5 – 7,0

Гліциновий буфер в діапазоні pH 4,0 – 5,8.

Враховуючи мінливість метода (до ± 2 – 3 % в LMW є звичайним явищем при застосуванні Bioanalyzer), інші умови (такі як решта композицій в гістидинових і сукцинатних буферах) спостерігали для підтримання % LMW відносно низькими і тому їх слід досліджувати далі.

Видимі частинки при візуальному огляді

Наявність видимих частинок оцінювали візуальним оглядом до і після термічного навантаження. Змінювані умови в цитрат - фосфатному буфері можуть генерувати наявність видимих частинок (частіше за все тверді частинки – такі як в суспензії) після термічного навантаження.

В гліциновому буфері утворення частинок частіше за все пов'язано з присутністю видів Tween species (зразок ID № 23, 24, 26, 28, що містить Tween 40) і склад № 30, що містить Tween 80. Інші склади в гліциновому буфері (зразок ID від № 32 до № 39), показали наявність частинок в момент часу 0, які мали тенденцію до зменшення при навантаженні (можливі оборотні кластери).

В гістидині види Tween зазвичай пов'язані з утворенням видимих частинок при навантаженні (всі склади, що показують видимі частинки після навантаження містять одну з двох альтернатив Tween).

Було виявлено, що в сукцинатному буфері частинки, спостережувані в момент часу 0 у більшості складів, зменшуються при термічному навантаженні (можливе порушення оборотних асоціацій з плином часу).

Виводи: термічне навантаження

Відповідно до SE – HPLC, ОГ і Bionalyzer при термічному навантаженні, умови, які можуть забезпечити сприятливі характеристики, охоплюють:

Буфери: цитрат – фосфат або гліцин (переважно при більш кислому pH і найбільш актуально в діапазоні 4,0 – 5,0 для цитрат - фосфату і 4,0 – 5,8 для гліцину),

Концентрація буферу: переважно низька (згідно з результатом індексу агрегації),

Стабілізатор: конкретні показники не отримані,

Поверхнево-активна речовина: Kolliphor ELP, як було виявлено, є ефективним у зменшенні невидимих неозброєним оком частинок.

2.3.2 Вплив світловим випроміненням

Індекс агрегації за ОГ

Було виявлено, що індекс агрегації у більшості композицій DoE в цитрат - фосфатному буфері вище, ніж в контрольній формулі (найбільш значно у більш високому діапазоні pH). Ефект pH був також підтверджений в гліциновому буфері, який, як було установлено, значно знижував індекс агрегації відносно цитрат – фосфатного буферу (в діапазоні pH 4.0 – 4.5 були виділені значення, порівняні з еталонними композиціями або нижче). Гістидин зазвичай може викликати значне збільшення індексу агрегації, також як і сукцинатний буфер (гістидин є помітно гіршим, ніж сукцинат).

Статистичний аналіз, проведений ANOVA, підтвердив значний вплив типу буферу, pH і концентрації (p – значення < 0.0001), що свідчить про те, що найкращі умови для мінімізації

утворення частинок охоплюють використання цитрат-фосфатного буферу (в діапазоні 4,0 – 5,0 і при низькій концентрації буферу), гліцин (в діапазоні 4,0 – 5,8).

Було також виявлено, що поверхнево-активна речовина має деякий вплив на стабільність, оскільки Kolliphor ELP є найкращим варіантом, який слід приймати до уваги при намаганні зменшити кількість частинок.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE-HPLC

Кількість агрегатів (HMW) визначали за допомогою SE – HPLC у момент часу 0 і під впливом стресу від світлового випромінення. Цитрат – фосфат, як правило, призводить до більш високої агрегації, ніж еталонна формула, особливо при підвищенні pH. В гліциновому буфері переважними є низькі діапазони (нижче 4,8), тому що більш високі значення pH пов'язані з більш високою агрегацією (аналогічно використанню цитратного буферу). Сукцинат зазвичай призводить до більш високих значень агрегації, ніж еталонний, при всіх умовах, у той час як гістидиновий буфер (весь діапазон, за виключенням деяких виключень) ймовірно, забезпечує значення агрегації, порівняні з еталонними.

Дані також були статистично оцінені за допомогою ANOVA для лінійної моделі поверхні відгуку, і було підтверджено, що тип буферу є значущим фактором (p-значення < 0,0001).

В цілому, для того, щоб зменшити агрегати при термічному навантаженні, гліцин (діапазон pH 4,0 – 5,0) і гістидин (діапазон pH 5.0 – 6.0) повинні бути більш переважними, ніж сукцинатний і цитрат-фосфатний буфери.

Важливо, що стабілізатори, такі як лізин, декстроза, сорбіт і цукроза забезпечують кращу стабілізацію від впливу світловим випроміненням, ніж хлорид натрію, мальтоза й іноозит (p – значення < 0,01).

Чистота за допомогою CE-SDS

Чистота, визначена за допомогою CE – SDS, несе інформацію як про HMW, так і про LMW види, оскільки вона є результатом розрахунку: 100 - % HMW за допомогою CE – SDS - % LMW за допомогою CE – SDS.

Значення чистоти були визначені до і після впливу світлового випромінення.

Більшість складів демонструють більш високу чистоту, ніж еталонні склади під впливом стресу від світлового випромінення. Умовами, які можуть негативно впливати на стабільність, зазвичай є: цитрат - фосфат при високому pH (> 7,0) і гліциновий буфер при низькому pH (4,0); останнє, скоріше за все, пояснюється негативним впливом від Tween 40/Kollidon 12PF при низькому pH.

Було виявлено, що гістидин позитивно впливає на чистоту, максимізуючи ефективність складу проти впливу світла.

Статистичний аналіз за допомогою ANOVA підтвердив чудову властивість, зв'язану з використанням гістидину як буферу, з порівняними характеристиками, одержаними при використанні цитрат – фосфатного, гліцинового або сукцинатного буферів.

Профіль ізоформ за cIEF

Профілі ізоформ визначали в момент часу 0 і після впливу світла. Вплив світла зазвичай визначає збільшення кислотних ізоформ через явища фотоокисненння. Таке збільшення було розраховане для всіх складів DoE.

Декілька умов є сприятливими для стабілізації білка (тобто більш низькі зміни в профілі ізоформ), такі як цитрат - фосфатний і гліциновий буфер (найбільш типово у більш низькому діапазоні pH). Більш низькі показники спостерігають, коли гістидин використовують як буферу складу.

Дані, оцінені за допомогою ANOVA для лінійної моделі поверхні відгуку, підтвердили зазначене вище (статистично значущий фактор типу буферу з p - значенням < 0,0001).

Статистичний аналіз також підтвердив позитивний вплив (зменшення зміни кислих ізоформ), коли L-лізин використовують як стабілізатор. Ефект є достатньо очевидним при спостереженні змін, виявлених в складах № 11, 29, 31, 38, значно менших, ніж зміни у навколишньому просторі складу з альтернативними стабілізаторами.

Видимі частинки при візуальному огляді

Наявність видимих частинок оцінювали візуальним оглядом до і після стресу від впливу світлового випромінення. Більшість складів не піддають впливу світлового стресу з причини видимих частинок. Нет особливих умов, зв'язаних з утворенням частинок під впливом стресу від світлового випромінення.

Висновок: стрес від впливу світлового випромінення

Відповідно до SE – HPLC, ОГ, CE – SDS, cIEF і візуальний огляд під впливом стресу від світлового випромінення, умови, які можуть забезпечити сприятливі характеристики, охоплюють:

Буфери: гліциновий буфер (переважно при більш кислому pH і найбільш актуально в діапазоні 4.0 – 4.5),

Концентрація буферу: переважно низька (згідно з результатом індексу агрегації),

Стабілізатор: лізин (моногідрохлорид), декстроза і сорбіт показав позитивний вплив на стабільність білка,

Поверхнево-активна речовина: Kolliphor ELP, як було виявлено, є ефективним в зменшенні частинок, яких не видно неозброєним оком.

2.3.3 Заморожування – відтаювання

Індекс агрегації за оптичною густиною

Після 3X циклів заморожування-відтаювання (-80 °C → кімнатна температура), ще раз підтверджується, що гліциновий буфер (низький pH) забезпечує самі низькі значення, що вказують на більш низьке утворення частинок. Збільшення індексу агрегації спостерігають як в цитрат - фосфатному буфері, так і в гліциновому буфері при збільшенні pH (ефект pH є більш критичним в цитрат - фосфатному буфері). Зазвичай більш високі значення індексу агрегації, ніж у контрольній композиції, спостерігають в гістидиновому і сукцинатному буферах.

Статистичний аналіз за допомогою ANOVA виявив помірно значущий вплив типу буферу, pH і типу поверхнево-активної речовини (0,01 < p – значення < 0,05), вказуючи на те, що цитрат – фосфатний і гліциновий буфери при pH нижче 6,0 є кращим варіантом для стабілізації білка проти утворення частинок, викликаного заморожуванням-відтаюванням, тому що сукцинат і гістидиновий буфер є трохи несприятливими відносно контрольної композиції.

Порівняння впливу різних поверхнево-активних речовин показує порівняні характеристики від Tween 80, Kollidon 12PF і Kolliphor ELP (трохи біль переважний), у той час як Tween 40, як очікують, збільшить індекс агрегації.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE – HPLC

Всі склади показують більш низьку загальну кількість агрегатів, ніж контрольна композиція при стресі заморожування і відтаювання (значення, порівняні з часом 0).

В цитрат - фосфатному буфері агрегати мають тенденцію збільшуватися до рівня еталонної композиції, оскільки первинний ефект pH (2,0 – 2,5 % HMW) збільшується до діапазону 7,0 – 7,5 з меншими/незначними змінами при заморожуванні-відтаюванні, у той час як при pH < 7,0 загальна кількість агрегатів зазвичай складають менше 1,5 % (до і після навантаження).

В гліциновому і гістидиновому буфері всі значення загальної кількості агрегатів після навантаження складають менше 1 % (порівняно зі значеннями часу 0). В сукцинаті не було виявлено, що заморожування-відтаювання визначає критичні зміни відносно часу 0, однак загальна кількість агрегатів, як правило, набагато вище, ніж в гліцині й гістидині (все ще дорівнюють або нижче 1,5 %, тобто значно нижче, ніж еталонні після навантаження).

Статистичний аналіз підтвердив значний вплив типу буферу і pH (значення p < 0.0001), оскільки цитрат – фосфатний буфер (pH 4,0 – 6,0), гліциновий буфер (pH 4,0 – 7,0) і гістидин (5.0 – 6.6) є найкращими варіантами для стабілізації білка від заморожування – відтаювання.

Значний вплив (значення p < 0.01) також було виділено для фактору типу стабілізатора: гідрохлорид лізину мінімізує агрегацію часу 0 і ефекти, зв'язані з навантаженням заморожування-відтаювання (див. Sampe ID № 6-9-11-17 в цитратному буфері); цукроза і декстроза аналогічно проявляють стабілізувальні властивості.

Видимі частинки при візуальному огляді

За результатами візуального огляду при замерзанні – відтаюванні можна виділити загальні тенденції:

В цитрат – фосфатному, утворення частинок є більш ймовірним при більш високому pH,

В гліциновому буфері при низькому pH (< 5) утворення частинок пов'язано головним чином з присутністю Tween 40 (що дестабілізує поверхнево-активної речовини),

В гістидиновому буфері види Tween зазвичай пов'язані з утворенням частинок,

В сукцинаті, можливо, відсутні специфічні фактори, зв'язані з утворенням частинок, що, тем не менше, доволі часто зустрічається при використанні цього буферу.

Висновок: навантаження заморожування-відтаювання

Відповідно до SE – HPLC, ОГ і візуальним оглядом при 3X циклах заморожування - відтаювання (-80 °C → кімнатна температура), умови, які можуть забезпечити сприятливі покращені характеристики, охоплюють:

Буфери: гліцин або цитрат – фосфатні буфери (переважно при більш кислих значеннях pH і найбільш переважно в діапазоні 4,0 – 6,0),

Стабілізатор: лізин (моногідрохлорид), декстроза і цукроза показали позитивний вплив на стабільність білка (зменшення загальної кількості агрегатів за допомогою SE – HPLC),

Поверхнево-активна речовина: слід приймати до уваги несумісність видів Tween із

забуференими гліцином і гістидином складами і уникати їх, щоб мінімізувати утворення видимих частинок.

2.3.4 Механічне навантаження

Індекс агрегації за оптичною густиною

Як було показано раніше, фактори, які припускають значення індексу агрегації, найбільш схожі на еталонні (тобто мінімальні або не які не збільшуються за часом 0) являють собою:

Цитрат – фосфат, як правило, призводить до більш високих значень індексу агрегації, ніж еталонний, особливо при підвищенні pH і в присутності видів Tween: Sampe ID № 2 (Tween 40), № 8 (Tween 80), № 11 (Tween 40), № 19 (Tween 40), № 21 (Tween 40).

Гліцин забезпечує явний стабілізувальний ефект в діапазоні низьких значений pH (значення індексу агрегації трохи нижче, ніж у контрольних).

Гістидиновий буфер переважно слід використовувати при значеннях pH близьких до 5,0 і без Tween 40 і Tween 80, що ймовірно пов'язано з самими високими значеннями індексу агрегації: Sampe ID № 50 (Tween 40), № 60 (Tween 80), № 62 (Tween 40).

Сукцинат, як правило, призводить к тому, що значення індексу агрегації трохи вище, ніж у контрольної композиції, незалежно від конкретних залучених факторів.

Наведені вище результати були підтверджені за допомогою ANOVA, який вказав тип буферу і pH як статистично значущих факторів (значення $p < 0,01$) і поверхнево-активну речовину як помірно значущого фактору ($0,01 <$ значення $p < 0.05$).

Гліциновий буфер при низькому pH (4.0 – 5.5) виділяється як буфер вибору, щоб мінімізувати індекс агрегації. Тенденція до збільшення індексу агрегації, заданого видами Tween (Tween 40 гірше, ніж Tween 80), підтверджується моделями поверхневого відгуку.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE – HPLC

Мінімальне збільшення відносно часу 0 спостерігали для більшості складів, що вказує на незначний вплив цього типу навантаження. Як вже було зазначено, диференціація за загальною кількістю агрегатів, ймовірно, є первинним ефектом типу буферу і pH.

Тип буферу і pH підтверджені статистично значимими факторами за допомогою ANOVA (значення $p < 0.0001$); а також концентрація буферу (значення $p < 0.01$) і тип стабілізатора ($0.01 <$ значення $p < 0.05$).

Переважні діапазони і умови для мінімізації агрегатів до рівня еталонної композиції (< 1 %) охоплюють: цитрат – фосфатний буфер (pH < 5 і низька іонна сила); гліциновий буфер (весь діапазон pH та іонної сили); гістидиновий буфер (весь спектр) і сукцинатний буфер (pH 5.0 – 5.5 і низка іонна сила). Переважними стабілізаторами є моногідрохлорид L-лізину, мальтоза, цукроза і декстроза.

Фрагменти за допомогою Bioanalyzer

За виключенням Sampe ID № 22-23-24 (в гліциновому буфері, pH 4.0, що містить Tween 40 або Kollidon 12PF), решта складів показали LMW %, порівняні або менші, ніж у контрольній композиції при механічному навантаженні, також приймаючи до уваги мінливість цього метода (± 2-3 % в LMW % результатів є характерним). Таким чином, можна зробити висновок, що більшість протестованих умов можуть допомогти покращити стійкість білка до фрагментації за умови, що уникають таких комбінацій, як гліциновий буфер (низький pH) + Tween 40.

Статистична розробка висунула на перший план кращі характеристики складів в сукцинатному і гістидиновому буферах, які, однак повинні бути ретельно розглянуті й оцінені як суттєво порівняні з/трохи краще, ніж інші формули в цитрат – фосфатному і гліциновому буфері через розглянуту вище мінливість методу.

Видимі частинки при візуальному огляді

В результатах візуального огляду при заморожуванні - відтаюванні виділяють загальні тенденції:

В цитрат - фосфатному буфері (Sampe ID № 1 – 21), утворення частинок відбувається практично за будь-яких умов, незалежно від залучених конкретних факторів,

В гліциновому буфері утворення частинок пов'язано в первую чергу з присутністю Tween 40 (Sampe ID № 23, 26, 28 і Kollidon 12PF (склади № 22, 32, 37, 43)

В гістидиновому буфері всі формули, що показують збільшення видимих частинок при механічному струшуванні, містять або Tween 40, або Tween 80,

В сукцинаті, здається, відсутні конкретні фактори, зв'язані з утворенням частинок.

Висновок: механічне навантаження

Відповідно до SE – HPLC, ОГ, Bioanalyzer і візуальним оглядом при механічному струшуванні, які можуть забезпечити сприятливі характеристики відносно еталонних композицій, охоплюють:

Буфери: гліцин (переважно при більш кислому pH і найбільш переважно в діапазоні 4.0 –

5.5), гістидин і сукцинат при pH приблизно 5.0.

Стабілізатор: лізин (моногідрохлорид), цукроза, мальтоза і декстроза показали позитивний вплив на стабільність білка (зменшення загальної кількості агрегатів за допомогою SE – HPLC),

Поверхнево-активна речовина: слід приймати до уваги несумісність видів Tween із забуференими гліцином і гістидином складами і уникати їх, щоб мінімізувати утворення видимих частинок.

Приклад 3 – Оптимізація складів

3.1 Оптимізація складу

Дані, показані в Прикладі 2, були поєднані, щоб ідентифікувати простір складу, який міг би належним чином стабілізувати Авелумаб (оцінювані фактори: тип буферу, pH і силу, тип стабілізатора і поверхнево-активна речовина) проти термічного, заморожування – відтаювання, механічного і світлового навантаження.

Використовуючи наступні критерії

мінімізувати HMW (за допомогою SE – HPLC) після термічного навантаження, механічного струшування, заморожування – відтаювання і впливу світловим випромінюванням,

мінімізувати LMW (за допомогою Bioanalyzer) після термічного навантаження і механічного струшування,

максимізувати чистоту (за допомогою CE-SDS) після впливу світловим випромінюванням,

мінімізувати зміну кислих ізоформ (за допомогою cIEF) після впливу світловим випромінюванням,

значення індексу цільової агрегації (по ОГ) нижче 2 після термічного навантаження, механічного струшування, заморожування – відтаювання і впливу світловим випромінюванням,

для кожного типу буферу 10 найбільш перспективних складів були екстрапольовані, як показано в Таблиці 5.

Таблиця 5

Досліджувані склади (екстраполяція DoE)

Номер	pH буферу	Буферна сила (мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)	Стабілізатор (280 мМ)	Тип буферу
1	4,4	10	Kolliphor ELP	Лізин	Гліцин
2	4,1	10	Tween 80	Лізин	Гліцин
3	4,0	10	Tween 80	Лізин	Гліцин
4	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гліцин
5	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гліцин
6	4,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гліцин
7	4,0	10	Kollidon 12PF	Лізин	Гліцин
8	4,0	10	Kolliphor ELP	Сорбіт	Гліцин
9	4,0	10	Kolliphor ELP	Цукроза	Гліцин
10	4,0	10	Kolliphor ELP	Цукроза	Гліцин

Номер	pH буферу	Буферна сила (мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)	Стабілізатор (280 мМ)	Тип буферу
1	4,0	10	Kollidon 12PF	Сорбіт	Цитрат-фосфат
2	4,2	15	Kollidon 12PF	Лізин	Цитрат-фосфат
3	4,3	17	Kollidon 12PF	Цукроза	Цитрат-фосфат
4	4,1	20	Kollidon 12PF	Лізин	Цитрат-фосфат
5	4,1	15	Tween 80	Лізин	Цитрат-фосфат
6	4,0	27	Kollidon 12PF	Цукроза	Цитрат-фосфат
7	4,1	19	Kolliphor ELP	Цукроза	Цитрат-фосфат
8	4,1	22	Kolliphor ELP	Декстроза	Цитрат-фосфат
9	4,2	13	Tween 80	Сорбіт	Цитрат-фосфат
10	4,2	17	Kolliphor ELP	Декстроза	Цитрат-фосфат

Номер	pH буферу	Буферна сила (мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)	Стабілізатор (280 мМ)	Тип буферу
1	5,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гістидин
2	5,0	10	Kolliphor ELP	Декстроза	Гістидин

3	5,0	10	Kolliphor ELP	Сорбіт	Гістидин
4	5,0	10	Kolliphor ELP	Цукроза	Гістидин
5	5,0	11	Kolliphor ELP	Цукроза	Гістидин
6	5,1	10	Kolliphor ELP	Сорбіт	Гістидин
7	5,1	10	Kolliphor ELP	Цукроза	Гістидин
8	5,0	10	Kolliphor ELP	Інозит	Гістидин
9	5,0	15	Kolliphor ELP	Сорбіт	Гістидин
10	5,0	10	Kolliphor ELP	Лізин	Гістидин

Номер	pH буферу	Буферна сила (мМ)	ПАР (0,5 мг/мл)	Стабілізатор (280 мМ)	Тип буферу
1	5,0	10	Kollidon 12PF	Цукроза	Сукцинат
2	5,0	10	Kolliphor ELP	Лізин	Сукцинат
3	5,0	10	Kolliphor ELP	Лізин	Сукцинат
4	5,0	12	Kolliphor ELP	Лізин	Сукцинат
5	5,1	10	Kolliphor ELP	Лізин	Сукцинат
6	5,1	10	Kollidon 12PF	Цукроза	Сукцинат
7	5,0	10	Kollidon 12PF	Сорбіт	Сукцинат
8	5,0	10	Kollidon 12PF	Лізин	Сукцинат
9	5,0	10	Kollidon 12PF	Декстроза	Сукцинат
10	5,0	14	Kollidon 12PF	Цукроза	Сукцинат

3.2 Провідні склади для подальшої оцінки

Зі складів Таблиці 5 одинадцять складів, перерахованих в Таблиці 6, виявились найбільш перспективними. Відповідно, вони були виготовлені й оцінені під термічним навантаженням і повторних циклів заморожування-відтаювання відповідно до аналітичної панелі, показаній в Таблиці 7.

Термічне навантаження билу вибрано як найбільш релевантних стресових умов для оцінки характеристик складу і, можливо для прогнозування стабільності в умовах охолодження. Заморожування-відтаювання також розглядали для того, щоб передбачати будь-які проблеми, зв'язані з температурними коливаннями/зберіганням попередньо складених матеріалів DS.

Результати експериментів, проведених на цих складах, описані в наступних абзацах.

Таблиця 6

Провідні склади, одержані з DoE

DP	pH (± 0,1	Буфер	Буферна сила (мМ)	Стабілізатор	ПАР (0,5 мг/мл)
1	4.4	Гліцин	10	Лізин (моногідрохлорид) 280 мМ	Kolliphor ELP
2	4.4	Гліцин	10	Лізин (моногідрохлорид) 140 мМ	Kolliphor ELP
3	4.4	Гліцин	10	Лізин (моногідрат) 280 мМ	Kolliphor ELP
4	4.4	Гліцин	10	Ацетат лізину 140 мМ	Kolliphor ELP
5	4.1	Гліцин	10	Лізин (моногідрат) 280 мМ	Tween 80
6	5.0	Гістидин	10	Декстроза 280 мМ	Kolliphor ELP
7	5.0	Гістидин	10	Сахароза 280 мМ	Kolliphor ELP
8	4.2	Цитрат-фосфат	15	Лізин (моногідрохлорид) 140 мМ	Kollidon 17PF
9	4.3	Цитрат-фосфат	17	Сахароза 280 мМ	Kollidon 17PF

Таблиця 6 (продовження)

DP	pH (± 0,1	Буфер	Буферна сила (мМ)	Стабілізатор	ПАР (0,5 мг/мл)
10	5.0	Сукцинат	10	Лізин (моногідрохлорид) 140 мМ	Kolliphor ELP
11	5.0	Сукцинат	10	Сахароза 280 мМ	Kollidon 17PF

Таблиця 7

Панель аналізів, проведених на провідних складах

Тест	Час 0	Термічне навантаження (4 тижні при 40±2 °C 75 %ОВ)	Заморожування-відтаювання 3Х
Видимі частинки (візуально)	x	X	x
pH	x	X	-
Мутність (ОГ)	x	X	x
Невидимі частинки (PAMAS)	x	X	x
Вміст білка (ОГ)	x	X	-
HMW за допомогою SE-HPLC	x	X	x
LMW за допомогою Bioanalyzer	x	X	-
Профіль ізоформ за допомогою iCE	x	X	-
Третинна структура за допомогою CD	x	X	-

3.3 Виготовлення провідних складів, одержаних зі стадії DoE

Матеріал лікарської речовини складу: 18,6 мг/мл Авелумабу, 51 мг/мл D-маніту, 0,6 мг/мл льодяної оцтової кислоти, pH 5,2 (без поверхнево-активної речовини) врівноважували фільтрацією в тангенціальному потоці (з використанням касети Pellicon XL Biomax з відсіканням 50 КДа в PES) в трьох буферах:

10 мМ гліцин pH 4,4,

10 мМ гістидин pH 5,0,

15 мМ цитрат-фосфат pH 4,2,

10 мМ сукцинат pH 5,0.

Заміну буферу здійснювали з 5-кратним розведенням зазначеного вище DS в одному з чотирьох відповідних буферів і врівноваженням/концентруванням до одержання начального об'єму. Операція була повторена три рази. Чотири врівноважених матеріали лікарської речовини були досліджені на вміст білка за OD перед виготовленням складів.

Склади 1-5 (в гліциновому буфері)

Обмінний матеріал DS (21.8 мг/мл) зважували у скляній склянці (64.2 г). Потім додавали стабілізатор: моногідрохлорид лізину (3,58 грамів для DP1 або 1.79 г для DP2) або моногідрат лізину (3,22 грамів для DP3 і DP5) або ацетат лізину (2.02 г для DP4). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0,7 мл 50 мг/мл розчину Kolliphor ELP (в 10 мМ гліцин pH 4,4 для DP 1-2-3-4) або 0,7 мл 50 мг/мл Tween 80 (в 10 мМ гліцин pH 4.1 для DP5). Розчин перемішували до повного розчинення. PH вимірювали і доводили до цільового значення розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (70 г) за допомогою відповідного буферу.

Склади 6-7 (в гістидиновому буфері)

Обмінний матеріал DS (23.2 мг/мл) зважували у скляній склянці (60.3 г). Потім додавали стабілізатор: декстрозу (3.53 г для DP6) або сахарозу (6.71 г для DP7). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0.7 мл розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP (в 10 мМ гістидинового буферу pH 5.0 для DP6 і 7). Розчин перемішували до повного розчинення. Значення pH вимірювали і встановлювали до цільового (pH 5.0) з розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (70 г) за допомогою відповідного буферу (10 мМ гістидиновий буфер pH 5,0).

Склади 8-9 (в цитратно-фосфатному буфері)

Обмінний матеріал DS (23.4 мг/мл) зважували у скляній склянці (59.8 г). При необхідності

(DP9), концентрація буферу була відрегульована шляхом додавання лимонної кислоти (моногідрат) і гідрофосфат динатрію (дигідрат). Потім додавали стабілізатор: моногідрохлорид лізину (1.79 г для DP8) або сахарозу (6.71 г для DP9). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 35 мг Kollidon 17PF (для обох DP8 і 9). Розчин перемішували до повного розчинення. Значення pH вимірювали і встановлювали до цільового (pH 4,2 для DP8 і 4,3 для DP9) з розведеною о-фосфорною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (70 г) за допомогою відповідного буферу.

Склади 10-11 (в сукцинатному буфері)

Обмінний матеріал DS (24.5 мг/мл) зважували у скляній склянці (57,1 г). Потім додавали стабілізатор: моногідрохлорид лізину (1.79 г для DP10) або сахарозу (6.71 г для DP11). Розчин перемішували до повного розчинення. Потім додавали поверхнево-активну речовину: 0.7 мл маточного розчину 50 мг/мл Kolliphor ELP в 10 мМ сукцинатного буферу pH 5.0 (DP10) або 35 мг Kollidon 17PF (DP11). Розчин перемішували до повного розчинення. Значення pH вимірювали і встановлювали до цільового (pH 5.0 для DP10 і 11) з розведеною соляною кислотою або гідроксидом натрію. Розчин доводили до кінцевої маси (70 г) з 10 мМ сукцинатного буферу pH 5.0.

3.4 Результати

3.4.1 Термічне навантаження

Вміст білка за ОГ: ніяких значних змін відносно часу 0 після 4 тижнів при 40 °C не спостерігали.

pH: значення pH в момент часу 0 відповідали цілі. Ніяких суттєвих змін не спостерігали відносно часу 0 після 4 тижнів при 40 °C.

Видимі частинки при візуальному огляді

Було виявлено, що всі склади не містять видимих частинок в період часу 0. В стресових умовах один склад (DP6) показав наявність частинок (можливо, зв'язаний зі складом).

Мутність шляхом нефелометрії

Більшість складів мають значення мутності в прозорому або трохи опалесцентному діапазоні з мінімальними змінами після навантаження (DP 2-4-6-7-9-10-11). Інші склади показують або більш високі зміни мутності від трохи опалесцентного до опалесцентного діапазону (DP1), або значення в опалесцентному діапазоні вже в момент часу 0 з меншими/незначними змінами після навантаження (DP 3-8). Склад DP5 показує значне збільшення мутності (> 18 NTU) після навантаження.

Невидимі неозброєним оком частинки при затемнені світловим випромінюванням

Частинки ≥ 25 мікрон були значно нижче межі фармакопеї 600 частинок/контейнер (типово < 100 частинок).

Частинки ≥ мікрон мали декілька більшу кількість, але все ще були нижче межі 6000 частинок/контейнер. DP8 і 9, в цитрат-фосфатному буфері показали більш високі показники, ніж інші (все ще нижче зазначеного вище межі) в момент часу 0, зі значним зниженням після навантаження.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE-HPLC

Що стосується загальної кількості агрегатів за допомогою SE – HPLC в момент часу 0 і після термічного навантаження, DP 1-2-3-4 (гліциновий буфер) варіювався залежно від типу і кількості стабілізатора, але мав однакову силу буферу, поверхнево-активна речовина і pH): зменшення моногідрохлориду лізину з 280 мМ (DP1) до 140 мМ (DP2) ймовірно, сприяє стабільності білка. Більш висока швидкість агрегації була підтверджена при використанні моногідрату лізину при 280 мМ (DP3). Ацетат лізину (140 мМ) видавав ті ж самі характеристики, що і моногідрохлорид лізину, використовуваний в той же концентрації (DP2).

DP5 (гліциновий буфер) показав значне збільшення агрегатів (ймовірно через несприятливу комбінацію моногідрату лізину при 280 мМ + Tween 80 замість Kolliphor ELP).

DP6-7 (гістидиновий буфер) не показав змін в агрегатах.

DP8-9 (цитрат-фосфатний буфер): цукроза в DP9, ймовірно, є критичним фактором, який може значно покращити характеристики складу у порівнянні з DP8 (моногідрат лізину), тому що інші інгредієнти/параметри дуже схожі (той самий тип буферу, та ж сама поверхнево-активна речовина і подібний pH: 4.2 проти 4.3).

DP10-11 (сукцинатний буфер): значних змін в агрегації не спостерігали (аналогічні характеристики моногідрату лізину і сахарози у цьому буфері).

Низька молекулярна вага за допомогою Bioanalyzer

Фрагменти за допомогою Bioanalyzer в момент часу 0 і після термічного навантаження:

DP 1-2-3-4 (гліциновий буфер) варіювався залежно від типу і кількості стабілізатора, але мав однакову силу буферу, поверхнево-активна речовина і pH): подібне збільшення фрагментів (+3-

5 % після навантаження).

DP5 (гліциновий буфер) показав значне збільшення у видів з більш низькою молекулярною вагою (ймовірно, через несприятливу комбінацію моногідрату лізину при 280 мМ + Tween 80 замість Kolliphor ELP): + збільшення на 13 % після навантаження.

DP6-7 (гістидиновий буфер) не показав змін у фрагментах.

DP8-9 (цитрат-фосфатний буфер): цукроза в DP9 (+6 % у фрагментах після навантаження), ймовірно, є критичним фактором, який може значно покращити характеристики складу у порівнянні з DP8 (моногідрат лізину; +11 % у фрагментах), тому що інші інгредієнти/параметри дуже схожі (той самий тип буферу, то же поверхнево-активна речовина і подібний pH: 4.2 проти 4.3).

DP10-11 (сукцинатний буфер): мінімальні зміни для обох (аналогічні характеристики моногідрату лізину і сахарози у цьому буфері): +1-3 % у видів з більш низькою молекулярною вагою після навантаження.

Профіль ізоформ за допомогою cIEF

Профіль ізоформ у момент часу 0 і після термічного навантаження: при термічному навантаженні всі зразки зазвичай мають тенденцію втрачати частину основних видів з одночасним збільшенням кислотних видів і незначними змінами основних ізоформ. Більш докладно: DP 1-2-3-4-5 (гліциновий буфер): аналогічні зміни спостерігали в профілі ізоформ. Для п'яти зразків основні види зменшились приблизно на 10-12 % (збільшення кислотних ізоформ на 14 – 17 % і зменшення основних ізоформ на -4/-6 %).

DP 6-7 (гістидиновий буфер): DP6 показав значні зміни в профілі ізоформ, і одержані профілі не могли бути розроблені через ймовірну нестабільність від вибраних компонентів і або забруднення зразку до аналізу. DP7 показав зміни, аналогічні зразкам у гліциновому буфері.

DP8-9 (цитрат-фосфатний буфер): значні зміни в обох складах, більш високі, ніж спостережувані в інших буферах. Було виявлено, що кислотні види збільшуються до 24-29 % після навантаження.

DP10-11 (сукцинатний буфер): DP10 показав мінімальні зміни, навіть нижче, ніж у інших зразків в інших буферах: основні види зменшились приблизно на 7 % (збільшення кислих ізоформ приблизно на 12 % і зменшення основних ізоформ приблизно на -5 %). DP11 показав більш високі зміни (збільшення кислих ізоформ після навантаження складало +20 %).

Третинна структура за круговим дихроїзмом

Круговий дихроїзм проводили до і після навантаження на провідні склади.

Зразки розводили з WFI до 1,5 мг/мл і потім тестували в кварцових кюветах з довжиною шляху 1 см на спектрополяриметрі Jasco J-810 в діапазоні 250 нм – 320 нм при швидкості сканування 20 нм/хв. (чутливість: стандартна; полоса пропускання: 1 мм; шаг даних 0,2 нм; D.I.T.: 8 секунд; 4 повторення) при кімнатній температурі.

Конформація білка у більшості складів може бути ефективно збережена з невеликими змінами в області 260 – 280 нм (сигнали тирозину і феніаланіну). Однак можна спостерігати декілька виключень, які можуть вказувати на часткове руйнування/розгортання і втрату структури після термічного навантаження: DP5 (можливий вплив присутнього типу поверхнево-активної речовини), DP8 і 9 (склади в цитрат - фосфатному буфері; можливе вплив типу буферу і комбінації з іншими присутніми інгредієнтами).

3.4.2 Заморожування – відтаювання

Видимі частинки при візуальному огляді

Не було виявлено, що повторні цикли FT викликають значне збільшення видимих частинок. При навантаженні деякі склади являють собою волокноподібні частинки (не у вигляді частинок/осаду або інших форм, зазвичай зв'язаних зі складом).

Мутність шляхом нефелометрії

При заморожуванні-відтаюванні в складах, які тестують, не відбувається значних змін. Більшість складів є прозорими або трохи опалесцентними в момент часу 0 і після навантаження (виключення: DP3, 5, 8, діапазон опалесцентного розчину в момент часу 0, з незначними змінами після навантаження).

Невидимі неозброєним оком частинки при затемненні світловим випроміненням

Частинки ≥ 25 мікрон були значно нижче фармакопейного межі в 600 частинок/контейнер (зазвичай ≤ 100 частинок).

Частинки ≥ 10 мікрон мали більшу кількість, але все ще нижче межі 6000 частинок/контейнер. DP8 і 9, в цитрат-фосфатному буфері показують більш високі показники, ніж інші (все ще нижче зазначеного вище межі) в момент часу 0, без подальшого збільшення при навантаженні FT.

Загальна кількість агрегатів за допомогою SE – HPLC

В сумарних агрегатах за допомогою SE – HPLC до і після навантаження FT, мінімальні зміни спостерігали для всіх складів (загальна кількість агрегатів збільшилась на 0,2 – 0,5 % після 3 циклів FT).

3.5 Заключення

В гліциновому буфері, найбільш придатні умови для стабілізації антитіл охоплюють:
низька іонна концентрація (10 мМ),
низький pH (4.0 – 4.4),
Лізин (моногідрохлорид), декстроза, цукроза і сорбіт як стабілізатори,
Переважні поверхнево-активні речовини: Kolliphor ELP і Kollidon 12PF (Tween 80 можливо, слід уникати через проблеми з видимими частинками).

В сукцинатному буфері, найбільш придатні умови для стабілізації антитіл охоплюють:
низька іонна концентрація (10 мМ),
pH 5.0 – 5.1
Лізин (моногідрохлорид), декстроза, цукроза або сорбіт як стабілізатори,
Переважні поверхнево-активні речовини: Kolliphor ELP і Kollidon 12PF (Tween 80 можливо, слід уникати з-за проблем з видимими частинками).

В цитрат - фосфатному буфері, найбільш придатні умови для стабілізації антитіл охоплюють:
низька іонна концентрація (10 – 30 мМ),
низький pH (4.0 – 4.5),
Лізин (моногідрохлорид), декстроза, цукроза або сорбіт як стабілізатори.
Переважні поверхнево-активні речовини: Kolliphor ELP і Kollidon 12PF (Tween 80 можливо, слід уникати з-за проблем з видимими частинками).

В гістидиновому буфері, найбільш придатні умови для стабілізації антитіл охоплюють:
низька іонна концентрація (10-15 мМ),
pH 5.0 – 5.1,
Декстроза, цукроза, лізин (моногідрохлорид), інозит, сорбіт як стабілізатори.
Переважні поверхнево-активні речовини: Kolliphor ELP і Kollidon 12PF (Tween 80 можливо, слід уникати через проблеми з видимими частинками).

Було виявлено, що самими вигідними складами з Таблиці 6 були DP 2, 4, 7 і 10.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Merck Patent GmbH

<120> ВОДНИЙ СКЛАД АНТИТІЛА ПРОТИ PD-L1

<130> P 17/056

<160> 3

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 450
<212> білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність важкого ланцюга Авелумабу

<400> 1

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
```

```
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
Gly Lys
    450
```

<210> 2
<211> 449
<212> білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність важкого ланцюга Авелумабу, в якій відсутній С-кінцевий К

<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
Gly
```

<210> 3
<211> 216
<212> білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Послідовність легкого ланцюга Авелумабу

<400> 3

Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5				10					15		
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr
			20					25				30			
Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
		35					40					45			
Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Thr	Arg	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln
			100					105					110		
Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
		115					120					125			
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr
	130					135					140				
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys
145					150					155					160
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr
				165					170					175	
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His
			180					185					190		
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys
		195					200					205			
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								
	210					215									

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Водний фармацевтичний склад антитіла, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло, де зазначений авелумаб має послідовність важкого ланцюга або SEQ ID NO:1, або SEQ ID NO:2 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:3, і де зазначений авелумаб несе глікозилювання на Asn300, що містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають сумісну частку більше 70 % всіх видів гліканів;
(ii) гліцин в концентрації від 5 до 15 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу або сорбіт в концентрації від 100 до 320 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) полівінілпіролідон під номером CAS 9003-39-8 (молекулярна вага: 2000-3000 г/моль), рицинову олію поліоксил-35 або полісорбат-80 в концентрації від 0,25 до 0,75 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де
склад не містить антиоксиданту; і
склад має pH від 3,8 до 4,6.
2. Водний фармацевтичний склад антитіла, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;
де зазначений авелумаб має послідовність важкого ланцюга або SEQ ID NO:1, або SEQ ID NO:2 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:3, і де зазначений авелумаб несе глікозилювання на

Asn300, що містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають сумісну частку більше 70 % всіх видів гліканів;
(ii) сукцинат в концентрації від 5 до 15 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу або сорбіт в концентрації від 100 до 320 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) полівінілпіролідон під номером CAS 9003-39-8 (молекулярна вага: 2000-3000 г/моль) або рицинову олію поліоксил-35 в концентрації від 0,25 до 0,75 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де склад не містить антиоксиданту; і
де склад має pH від 4,9 до 5,2.
3. Водний фармацевтичний склад антитіла, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;
де зазначений авелумаб має послідовність важкого ланцюга або SEQ ID NO:1, або SEQ ID NO:2 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:3, і де зазначений авелумаб несе глікозилювання на Asn300, що містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають сумісну частку більше 70 % всіх видів гліканів;
(ii) гістидин в концентрації від 5 до 15 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) моногідрохлорид лізину, декстрозу, сахарозу, інозит або сорбіт в концентрації від 100 до 320 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) полівінілпіролідон під номером CAS 9003-39-8 (молекулярна вага: 2000-3000 г/моль) або рицинову олію поліоксил-35 в концентрації від 0,25 до 0,75 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де склад не містить антиоксиданту; і
де склад має pH від 4,8 до 5,2.
4. Склад за п. 1, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;
(ii) гліцин в концентрації 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де склад має pH від 4,2 до 4,6.
5. Водний фармацевтичний склад антитіла, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;
де зазначений авелумаб має послідовність важкого ланцюга або SEQ ID NO:1, або SEQ ID NO:2 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:3, і де зазначений авелумаб несе глікозилювання на Asn300, що містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають сумісну частку більше 70 % всіх видів гліканів;
(ii) гліцин в концентрації 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) ацетат лізину в концентрації 140 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де склад не містить антиоксиданту; і
де склад має pH від 4,2 до 4,6.
6. Склад за п. 3, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;
(ii) гістидин в концентрації 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;
(iii) сахарозу в концентрації 280 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;
(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;
де склад має pH від 4,8 до 5,2.
7. Водний фармацевтичний склад антитіла, що містить:
(i) авелумаб в концентрації від 1 до 20 мг/мл як антитіло;

де зазначений авелумаб має послідовність важкого ланцюга або SEQ ID NO:1, або SEQ ID NO:2 і послідовність легкого ланцюга SEQ ID NO:3, і де зазначений авелумаб несе глікозилювання на Asn300, що містить FA2 і FA2G1 як основні види гліканів, що мають сумісну частку більше 70 % всіх видів гліканів;

(ii) сукцинат в концентрації 10 мМ як буферний агент, і не містить жодного іншого буферного агента;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ як стабілізатор, і не містить жодного іншого стабілізатора;

(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл як поверхнево-активну речовину, і не містить жодної іншої поверхнево-активної речовини;

де склад не містить антиоксиданту; і

де склад має pH від 4,8 до 5,2.

8. Склад за п. 4, який містить:

(i) авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гліцин в концентрації 10 мМ;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду для ін'єкцій як розчинник;

де склад має pH від 4,3 до 4,5.

9. Склад за п. 5, який містить:

(i) авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гліцин в концентрації 10 мМ;

(iii) ацетат лізину в концентрації 140 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду для ін'єкцій як розчинник;

де склад має pH від 4,3 до 4,5.

10. Склад за п. 6, який містить:

(i) авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) гістидин в концентрації 10 мМ;

(iii) сахарозу в концентрації 280 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду для ін'єкцій як розчинник;

де склад має pH від 4,9 до 5,1.

11. Склад за п. 7, який містить:

(i) авелумаб в концентрації 20 мг/мл;

(ii) сукцинат в концентрації 10 мМ;

(iii) моногідрохлорид лізину в концентрації 140 мМ;

(iv) рицинову олію поліоксил-35 в концентрації 0,5 мг/мл;

(v) HCl або NaOH для регулювання pH;

(vi) воду для ін'єкцій як розчинник;

де склад має pH від 4,9 до 5,1.

12. Склад за будь-яким із пп. 1-11, призначений для внутрішньовенного введення.

13. Склад антитіла за будь-яким із пп. 1-12 для застосування у лікуванні раку.

Послідовність важкого ланцюга Авелумабу - SEQ ID NO 1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

Фіг. 1a

Послідовність важкого ланцюга Авелумабу, в якій відсутній
С-кінцевий К - SEQ ID NO 2

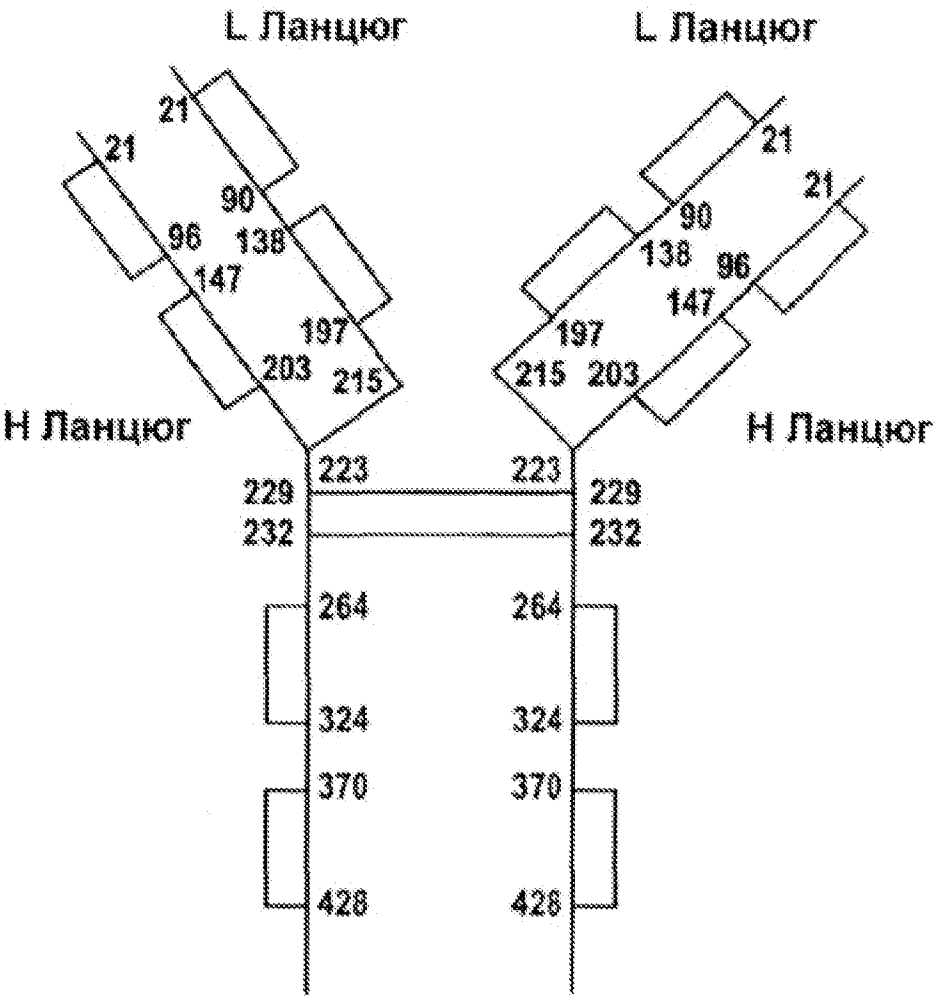
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG
GITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG

Фіг. 1b

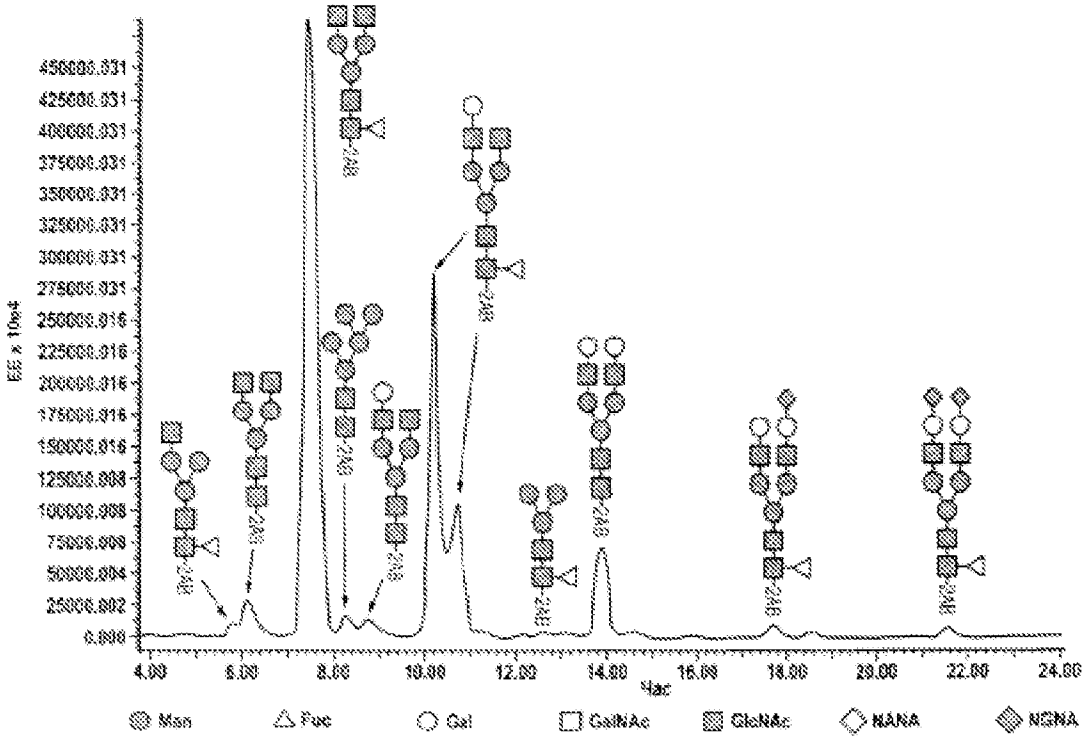
Послідовність легкого ланцюга Авелумабу - SEQ ID NO 3

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYDVSN
RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVLG
QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

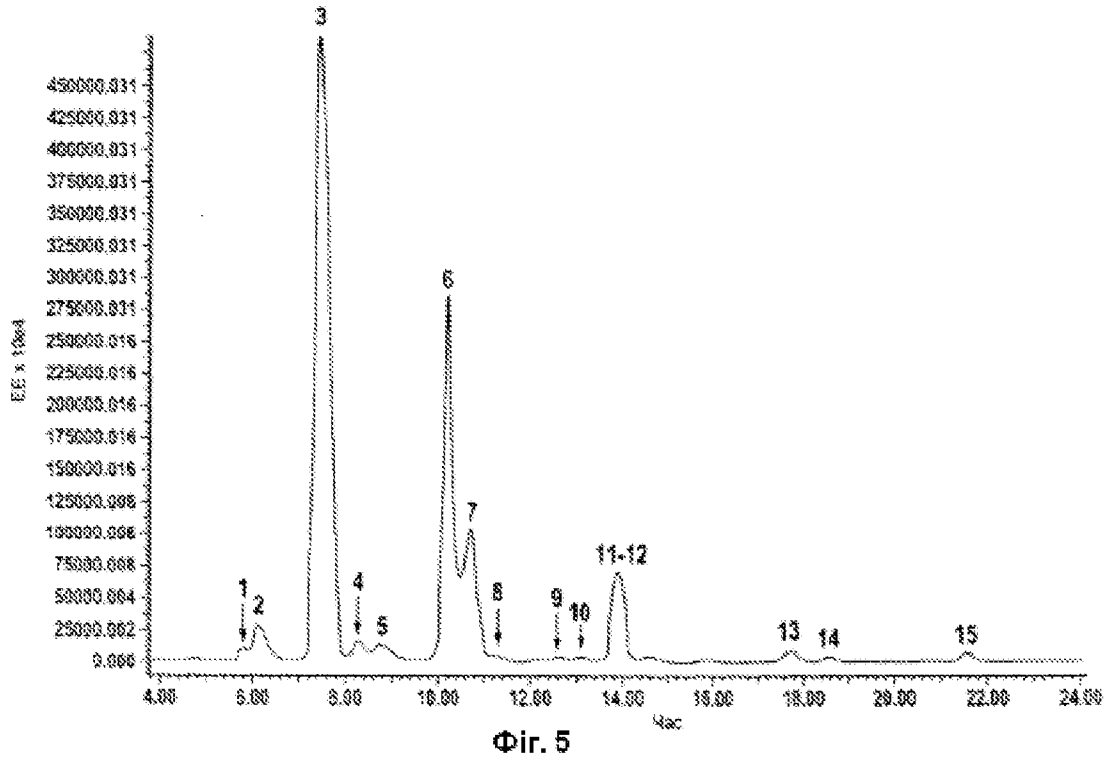
Фіг. 2


L Ланцюг
L Ланцюг
21
21
90
96
138
147
197
203
215
21
21
90
138
96
147
197
215
203
H Ланцюг
H Ланцюг
223
223
229
232
229
232
264
264
324
324
370
370
428
428

Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601