



(51) МПК

A61K 39/395 (2006.01)*A61K 9/08* (2006.01)*A61K 47/26* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004127446/15, 14.02.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.02.2003(30) Конвенционный приоритет:
14.02.2002 JP 2002-36244

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2005

(45) Опубликовано: 10.10.2008 Бюл. № 28

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 00/66160 A1, 09.11.2000. WO
98/22136, 28.05.1998. EP 0960936 A1,
01.12.1999. JP 63-088197 A, 19.04.1988. US
005945098 A, 31.08.1998. WO 9842376 A1,
01.10.1998. EP 0865793 A1, 23.09.1998. WO
9856418 A1, 17.12.1998.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
14.09.2004(86) Заявка РСТ:
JP 03/01563 (14.02.2003)(87) Публикация РСТ:
WO 03/068260 (21.08.2003)

Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517

(72) Автор(ы):

КАКУТА Масая (JP),
КИКУТИ Дзун (JP),
МИЦУСИМА Хидефуми (JP),
ИМАЕДА Йосими (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

RU 2 335 299 C 2

RU 2 335 299 C 2

(54) ПРЕПАРАТЫ В ФОРМЕ РАСТВОРОВ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к производству лекарственных средств. Предложены препараты в форме стабилизированного раствора, содержащие антитело против рецептора интерлейкина-6 или НМ1.24, включающие сахарозу в качестве

стабилизатора. Указанные препараты дополнительно могут включать поверхностно-активное вещество в качестве стабилизатора. Использование изобретения дает значимый эффект в предотвращении ассоциации молекул указанных антител при хранении растворов. 2 н. и 6 з.п. ф-лы, 18 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)*A61K 9/08* (2006.01)*A61K 47/26* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004127446/15, 14.02.2003**(24) Effective date for property rights: **14.02.2003**(30) Priority:
14.02.2002 JP 2002-36244(43) Application published: **10.04.2005**(45) Date of publication: **10.10.2008 Bull. 28**(85) Commencement of national phase: **14.09.2004**(86) PCT application:
JP 03/01563 (14.02.2003)(87) PCT publication:
WO 03/068260 (21.08.2003)Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):

**KAKUTA Masaja (JP),
KIKUTI Dzun (JP),
MITsUSIMA Khidefumi (JP),
IMAEDA Josimi (JP)**

(73) Proprietor(s):

ChUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)(54) **PREPARATIONS IN THE FORM OF SOLUTIONS, CONTAINING ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is referred to medicine area, namely, to production of medical products. Preparations in the form of the stabilized solution, containing an antibody against a receptor of interleukine-6 or HM1.24, including sucrose as the stabilizer are offered. The

specified preparations can additionally include surface-active substance as the stabilizer. Usage of the invention gives significant effect in prevention of association of molecules of the specified antibodies, during storage of solutions.

EFFECT: obtaining of preparations, containing antibodies.

8 cl, 18 tbl, 12 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к стабильным препаратам в форме растворов, содержащим антитела.

Предпосылки создания изобретения

5 С развитием технологии генной инженерии стало возможным использование антител, таких как иммуноглобулины, моноклональные антитела и гуманизированные антитела в качестве фармацевтических продуктов. Для поставки их в стабильных количествах необходимо создать условия получения и условия хранения, при которых может быть сохранена структура и активность антител.

10 Когда белки хранятся в растворах с высокой концентрацией, они обычно подвергаются повреждениям, например образованию нерастворимых агрегатов, которое должно быть предотвращено. Особенно, препараты антител имеют недостаток, состоящий в том, что они имеют тенденцию образовывать мультимеры, что приводит к появлению нерастворимых агрегатов во время хранения их в растворах.

15 Авторами изобретения, в частности, обнаружено, что антитела против IL-6-рецептора обладают терапевтическим действием на незрелые клетки миеломы (JPA HEI 8-99902), и им удалось получить в массовом количестве реконструированное гуманизированное антитело, антитело hPM-1, в качестве антитела против IL-6-рецептора, и авторы пытались приготавливать из этого очищенного антитела против IL-6-рецептора
20 фармацевтические продукты. Гуманизированное антитело против IL-6-рецептора является нестабильным белком, подверженным физическим и химическим изменениям, таким как ассоциация или агрегация, под воздействиями фильтрации, концентрирования, тепла и света при удалении вирусов и других микробов во время процессов очистки.

25 Когда антитела нужно получить способами генной инженерии, продуцирующие антитело клетки культивируют в объеме и очищают, получая при этом содержащий антитело раствор, который затем сохраняют в замороженном состоянии и оттаивают перед приготовлением препарата. Однако содержание антитела, оставшегося в таком растворе, снижалось во время повторных циклов замораживание/оттаивание за счет образования димеров антитела или нерастворимых частиц, или антитела деградировали с
30 образованием продуктов деградации во время длительного хранения.

Много усилий было затрачено для предоставления способа хранения белков в растворах и был обнаружен эффект стабилизации за счет добавления полимеров, в том числе белков, таких как альбумин сыворотки человека или очищенный желатин, или олигомеров, таких как полиолы, аминокислоты и поверхностно-активные вещества, в
35 качестве стабилизаторов для предотвращения химических или физических изменений. Однако добавление биополимеров, таких как белки, в качестве стабилизаторов было неудобным, так как оно требовало применения очень усложненной стадии исключения загрязняющих примесей, таких как вирусы и прионы. Что касается добавления олигомеров, его следует предпочтительно минимизировать.

40 Были также описаны (JPA HEI2001-503781) высушенные замораживанием препараты антител, стабилизированные сахарами или аминосахарами и поверхностно-активными веществами.

Тем не менее, были предприняты попытки разработки препаратов в виде стабильных, содержащих антитела растворов из-за большой потребности в препаратах в виде
45 растворов, удобных для использования, которые можно не растворять/восстанавливать перед использованием.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

50 Целью настоящего изобретения является предоставление препаратов в виде растворов, содержащих антитело, в которых содержание антитела сохраняется высоким и которые являются стабильными даже после длительного хранения за счет ингибирования образования нерастворимых частиц и мультимеров во время получения или хранения препаратов в форме растворов, содержащих антитело, и дополнительного ингибирования образования продуктов деградации.

В результате тщательных исследований для достижения указанной выше цели авторы создали настоящее изобретение на основе обнаружения того факта, что образование димеров во время циклов замораживание/оттаивание или образование мультимеров и продуктов деградации во время длительного хранения можно ингибировать добавлением сахара, и что образование нерастворимых частиц во время циклов замораживание/оттаивание может быть значительно ингибировано добавлением поверхностно-активного вещества.

В соответствии с этим, настоящее изобретение предоставляет:

- 5 (1) препарат в форме раствора, содержащий антитело, включающий сахар в качестве стабилизатора;
- 10 (2) препарат в форме раствора, как определено в (1), дополнительно включающий поверхностно-активное вещество в качестве стабилизатора;
- (3) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является сахарный спирт или невосстанавливающий олигосахарид;
- 15 (4) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является невосстанавливающий олигосахарид;
- (5) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является маннит, сахароза, трегалоза или раффиноза;
- (6) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является сахароза, трегалоза или раффиноза;
- 20 (7) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является сахароза или трегалоза;
- (8) препарат в форме раствора, как определено в (1) или (2), где сахаром является сахароза;
- 25 (9) препарат в форме раствора, как определено в любом одном из (2)-(8), где поверхностно-активным веществом является Полисорбат 80 или 20;
- (10) препарат в форме раствора, как определено в любом одном из (1)-(9), где антителом является рекомбинантное антитело;
- (11) препарат в форме раствора, как определено в (10), где антителом является химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека;
- 30 (12) препарат в форме раствора, как определено в любом одном из (1)-(11), где антителом является антитело класса IgG;
- (13) препарат в форме раствора, как определено в (12), где антителом класса IgG является антитело класса IgG1;
- 35 (14) препарат в форме раствора, как определено в любом одном из (1)-(13), где антителом является антитело против рецептора интерлейкина-6 или антитело против HM1.24;
- (15) способ ингибирования образования мультимерных молекул антитела в препарате в форме раствора, содержащем антитело, включающий добавление сахара к раствору;
- 40 (16) способ ингибирования образования мультимерных молекул антитела во время циклов замораживание/оттаивание содержащего антитело раствора, включающий добавление к раствору невосстанавливающего олигосахарида;
- (17) способ ингибирования образования мультимерных молекул антител во время циклов замораживание/оттаивание содержащего антитело раствора, включающий добавление в раствор невосстанавливающего дисахарида или невосстанавливающего трисахарида;
- 45 (18) способ ингибирования образования нерастворимых частиц во время циклов замораживание/оттаивание содержащего антитело раствора, включающий добавление поверхностно-активного вещества, и
- 50 (19) способ стабилизации антитела во время циклов замораживание/оттаивание содержащего антитело раствора, включающий добавление невосстанавливающего сахара и поверхностно-активного вещества.

НАИБОЛЕЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Используемый здесь термин «препарат в форме раствора, содержащий антитело» означает препарат в форме раствора, содержащий антитело в качестве активного ингредиента и полученный для введения животным, таким как люди, предпочтительно без включения любых стадий сушки замораживанием в процессе получения.

5 Используемый здесь термин «содержащий антитело раствор» может быть раствором, содержащим любое антитело, независимо от того, является ли оно биологически полученным или рекомбинантным, предпочтительно культуральной средой, в которой были культивированы клетки млекопитающего, такие как клетки CHO, содержащие антитело, или раствором, полученным при обработке такой среды, такой как частичная очистка (всего
10 объема раствора), или препаратом в форме раствора, полученным для введения животным, таким как люди, как указано выше.

Используемый здесь термин «нерастворимые частицы» означает вещества в виде нерастворимых частиц размером 10 мкм или больше, как указано в разделе Insoluble Particulate Matter Test for Injections, часть General Tests, Processes and Apparatus
15 в Японской фармакопее (Japanese Pharmacopoeia). Нерастворимые частицы могут быть измерены с использованием микроскопов, фильтров, собирающих нерастворимые частицы, и аналитических мембранных фильтров или, что удобно, с использованием автоматических счетчиков частиц по затемнению света.

Используемый здесь термин «нерастворимые вещества» означает легко
20 обнаруживаемые нерастворимые вещества, которые не должны содержаться в инъектируемых препаратах и в отсутствие которых инъектируемые препараты должны быть прозрачными при обследовании в контейнерах невооруженным глазом при интенсивности света приблизительно 1000 люкс под лампой накаливания, как указано в разделе Foreign Insoluble Matter Test for Injections, часть General Tests, Processes and Apparatus в
25 Японской фармакопее.

Используемый здесь термин «мультимеры» и «продукты деградации» означают мультимеры и продукты деградации, соответственно, молекул антитела, представляющих активный ингредиент препаратов, и их содержание может быть определено способом оценки процента площади пика на основе описанной ниже гель-проникающей
30 хроматографии.

Антитела, используемые в препаратах в форме растворов настоящего изобретения, конкретно не ограничиваются, поскольку они связываются с нужным антигеном, в качестве подходящего антитела могут быть использованы мышьиные антитела, крысиные антитела, кроличьи антитела, овечьи антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела,
35 антитела человека и тому подобное. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, но предпочтительны моноклональные антитела, поскольку гомогенные антитела могут быть стабильно получены. Поликлональные и моноклональные антитела могут быть получены способами, хорошо известными специалисту в данной области.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, могут быть в основном
40 сконструированы известными способами следующим образом. Требуемый антиген или клетку, экспрессирующую требуемый антиген, используют в качестве иммунизирующего антигена для иммунизации клеток-хозяев по стандартному способу иммунизации и образовавшиеся иммунизированные клетки подвергают слиянию с известными родительскими клетками стандартными способами слияния клеток, и затем слитые клетки
45 подвергают скринингу для выявления клеток, продуцирующих моноклональные антитела (гибридом) стандартным методом скрининга. Конструирование гибридом может быть проведено по способу Milstein et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46). Если антиген имеет низкую иммуногенность, он может быть связан с иммуногенной макромолекулой, такой как альбумин, и использован для иммунизации.

50 Могут быть использованы рекомбинантные антитела, которые получают трансформацией хозяина подходящим вектором, содержащим ген антитела, клонированный из гибридомы с использованием способов генной инженерии (см., например, Carl, A.K. Vorrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL

ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS, LTD, 1990). В частности, кДНК-последовательности для переменных областей (области V) антитела синтезируют из мРНК гибридомы с использованием обратной транскриптазы. После того как ДНК-последовательности, кодирующие области V представляющего интерес антитела, 5 были получены, они могут быть связаны с ДНК-последовательностями, кодирующими константные области (области C) представляющего интерес антитела, и интегрированы в вектор экспрессии. В альтернативном случае, ДНК-последовательности, кодирующие области V антитела, могут быть интегрированы в содержащие вектор экспрессии ДНК-последовательности для областей C антитела. Их интегрируют в вектор экспрессии таким 10 образом, чтобы они могли быть экспрессированы под контролем регуляторных областей, таких как энхансеры и промоторы. Затем клетка-хозяин может быть трансформирована этим вектором экспрессии для экспрессии антитела.

В настоящем изобретении могут быть использованы рекомбинантные антитела, т.е. антитела, искусственным образом модифицированные для снижения антигенности у людей 15 или для достижения других целей, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела. Эти модифицированные антитела могут быть получены известными способами. Химерные антитела состоят из переменных областей тяжелой и легкой цепи антитела млекопитающего, но не человека, такого как мышь, и константных областей тяжелой и легкой цепи антитела человека и могут быть получены связыванием ДНК- 20 последовательностей, кодирующих переменные области мышиного антитела, с ДНК-последовательностями для константных областей антитела человека и трансформацией хозяина вектором экспрессии, содержащим связанные последовательности, чтобы позволить ему продуцировать химерное антитело.

Гуманизированные антитела называют также реконструированными антителами 25 человека, их получают трансплантацией определяющих комплементарность областей (CDRs) антитела млекопитающего, но не человека, такого как мышь, в определяющие комплементарность области антитела человека, обычные способы генной рекомбинации для получения их также являются известными. В частности, ДНК-последовательности, сконструированные для связывания CDRs мышиного антитела с каркасными областями 30 (FRs) антитела человека, синтезируют полимеразной цепной реакцией (PCR) из нескольких олигонуклеотидов, полученных для того, чтобы иметь концевые перекрывающиеся области. Образовавшиеся ДНК-последовательности связывают с ДНК-последовательностями, кодирующими константные области антитела человека и затем интегрируют в вектор экспрессии, который трансформируют в хозяина, чтобы позволить 35 ему продуцировать реконструированное антитело (см. Европейскую патентную публикацию № EP 239400, Международную публикацию № WO 96/02576). Области FRs антитела человека, связанные CDRs, выбирают таким образом, чтобы определяющие комплементарность области образовывали подходящий, связывающий антиген сайт. Если необходимо, реконструированные гуманизированные антитела могут иметь некоторые 40 аминокислотные изменения в основных областях переменных областей так, чтобы определяющие комплементарность области образовывали подходящий сайт, связывающий антиген (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Способы получения антител человека также известны. Например, требуемое антитело человека, обладающее активностью связывания для требуемого антигена, может быть 45 получено *in vitro* иммунизацией лимфоцитов человека требуемым антигеном или клеткой, экспрессирующей требуемый антиген, и слиянием иммунизированных лимфоцитов с клетками миеломы человека, такими как U266 (см. JPB № HEI1-59878). Требуемое антитело человека может быть также получено иммунизацией трансгенного животного, имеющего все спектры генов антител человека, антигеном (см. Международные 50 публикации №№ WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735). Способы получения антитела человека пэннингом с использованием библиотеки антител человека являются хорошо известными. Например, фаги, связывающиеся с антигеном, могут быть выбраны экспрессией переменных областей

антитела человека в виде одноцепочечных фрагментов антитела (scFv) на поверхностях фага способом фаг-дисплея. ДНК-последовательности, кодирующие переменные области антитела человека, связывающегося с антигеном, могут быть определены анализом генов выбранных фагов. Полное антитело человека может быть получено 5 приготовлением подходящего вектора экспрессии на основе определенных ДНК-последовательностей scFv-фрагментов, связывающихся с антигеном. Эти способы являются уже хорошо известными из WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388.

Когда антитело должно быть получено трансформацией предварительно выделенного 10 гена антитела в подходящего хозяина, подходящий хозяин может быть использован в комбинации с вектором экспрессии. Подходящие эукариотические клетки, используемые в качестве хозяев, включают животные клетки, растительные клетки и клетки грибов.

Известные животные клетки включают (1) клетки млекопитающего, такие как клетки CHO, COS, миеломы, ВНК (почек детеныша хомячка), HeLa и Vero; (2) клетки земноводного, 15 такие как ооциты Xenopus, или (3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 и Tn5.

Известные растительные клетки включают клетки Nicotiana, такого как Nicotiana tabacum, который может быть использован в виде каллусных культур. Известные грибковые клетки включают дрожжи, такие как Saccharomyces spp., например Saccharomyces 20 cerevisiae, и гифомицеты, такие как Aspergillus spp., например Aspergillus niger.

Прокариотные клетки могут быть использованы в качестве продуцирующих систем, использующих бактериальные клетки. Известные бактериальные клетки включают E. coli и Bacillus subtilis. Антитела могут быть получены трансформацией этих клеток представляющим интерес геном антитела и культивированием трансформированных клеток in vitro.

Антитела, содержащиеся в стабилизированных препаратах настоящего изобретения, включают, но не ограничиваются перечисленным, антитела против IL-6-рецептора, моноклональные антитела против антигена HM1.24, антитела против пептида, родственного паратироидному гормону (антитела против PTHrP), и тому подобное.

Предпочтительные реконструированные гуманизированные антитела для использования 30 в настоящем изобретения включают гуманизированные антитела против IL-6-рецептора (hPM-1) (см. Международную публикацию № WO92-19759), гуманизированные моноклональные антитела против антигена HM1.24 (см. международную публикацию № WO98-14580) и гуманизированные антитела против пептида, родственного паратироидному гормону (антитела против PTHrP) (см. международную публикацию № WO98-13388).

Антитела, содержащиеся в препаратах в форме растворов настоящего изобретения, могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, предпочтительно IgG, таким как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более предпочтительно IgG1.

Препараты в форме растворов, содержащие антитела, в настоящем изобретении предпочтительно не показывают увеличения содержания мультимеров и содержат 50 или 40 менее нерастворимых частиц на мл после цикла замораживание/оттаивание.

В растворах, содержащих антитело, или препаратах в форме растворов настоящего изобретения образование димеров во время циклов замораживание/оттаивание может быть ингибировано добавлением сахаров. Сахара, которые могут быть использованы, включают невосстанавливающие олигосахариды, например невосстанавливающие 45 дисахариды, такие как сахароза и трегалоза, или невосстанавливающие трисахариды, такие как раффиноза, и особенно предпочтительными являются невосстанавливающие олигосахариды. Предпочтительными невосстанавливающими олигосахаридами являются невосстанавливающие дисахариды, более предпочтительно сахароза и трегалоза.

В растворах, содержащих антитела, или препаратах в форме растворов настоящего изобретения образование мультимеров и продуктов деградации во время длительного хранения может быть ингибировано добавлением сахаров. Сахара, которые могут быть использованы, включают сахарные спирты, такие как маннит и сорбит; и невосстанавливающие олигосахариды, например невосстанавливающие дисахариды,

такие как сахароза и трегалоза, или невосстанавливающие трисахариды, такие как раффиноза, среди которых особенно предпочтительными являются невосстанавливающие олигосахариды. Предпочтительными невосстанавливающими олигосахаридами являются невосстанавливающие дисахариды, более предпочтительно сахароза и трегалоза.

5 Сахара должны быть добавлены в количестве 0,1-500 мг/мл, предпочтительно 10-300 мг/мл, более предпочтительно 25-100 мг/мл.

В настоящем изобретении образование нерастворимых частиц во время циклов замораживание/оттаивание препаратов в форме растворов, содержащих антители, может быть очень значительно ингибировано добавлением поверхностно-активных веществ.

10 Обычные примеры поверхностно-активных веществ включают:

неионогенные поверхностно-активные вещества, например эфиры жирных кислот и сорбитана, такие как монокаприлат сорбитана, монолаурат сорбитана, монопальмитат сорбитана; эфиры жирных кислот и глицерина, такие как монокаприлат глицерина, мономирилат глицерина, моностеарат глицерина; эфиры жирных кислот и полиглицерина, такие как декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноолеат; эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, такие как монолаурат полиоксиэтиленсорбитана, моноолеат полиоксиэтиленсорбитана, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана, монопальмитат полиоксиэтиленсорбитана, триолеат полиоксиэтиленсорбитана, тристеарат полиоксиэтиленсорбитана; эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбита, такие как тетрастеарат полиоксиэтиленсорбита, тетраолеат полиоксиэтиленсорбита; эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленглицерина, такие как моностеарат полиоксиэтиленглицерина; эфиры жирных кислот и полиэтиленгликоля, такие как дистеарат полиэтиленгликоля; алкиловые простые эфиры полиоксиэтилена, такие как лауриловый эфир полиоксиэтилена; алкиловые простые эфиры

25 полиоксиэтиленполиоксипропилена, такие как эфир полиоксиэтиленполиоксипропилена и гликоля, пропиловый эфир полиоксиэтиленполиоксипропилена, цетиловый эфир полиоксиэтиленполиоксипропилена; полиоксиэтиленалкилфениловые эфиры, такие как полиоксиэтиленнонилфениловый эфир; полиоксиэтилированные отвержденные касторовые масла, такие как полиоксиэтилированное касторовое масло, полиоксиэтилированное отвержденное касторовое масло (полиоксиэтилированное гидрогенизированное касторовое масло); полиоксиэтилированные производные пчелиного воска, такие как пчелиный воск в виде полиоксиэтилированного сорбита; полиоксиэтилированные производные ланолина, такие как полиоксиэтиленланолин; амиды полиоксиэтиленжирных кислот, такие как амид полиоксиэтиленстеариновой кислоты, имеющий HLB (гидрофильно-липофильный баланс) 6-18;

35 анионогенные поверхностно-активные вещества, например алкилсульфаты, имеющие C10-18-алкильную группу, такие как цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат натрия; сульфаты полиоксиэтиленалкилового эфира, имеющие среднее число молей EO 2-4 и C10-C18-алкильную группу, такие как полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия; соли алкиловых эфиров сульфоянтарной кислоты, имеющих C8-18-алкильную группу, такие как лаурилсульфосукцинат натрия; и

природные поверхностно-активные вещества, например лецитин; глицерофосфолипиды; сфингофосфолипиды, такие как сфингомиелин; эфиры сахарозы и C12-18-жирных кислот.

Препараты настоящего изобретения могут содержать один или несколько этих

45 поверхностно-активных веществ в комбинации. Предпочтительными поверхностно-активными веществами для использования в препаратах в форме растворов настоящего изобретения являются эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, такие как Полисорбат 20, 40, 60 или 80, особенно Полисорбаты 20 и 80. Предпочтительными являются также полиоксиэтиленполиоксипропиленгликоли, такие как поллоксамеры (например, Плюроник® F-68).

50 Количество поверхностно-активных веществ, которое нужно добавить, варьирует в зависимости от типа конкретного используемого поверхностно-активного вещества, но оно обычно составляет 0,001-100 мг/мл, предпочтительно 0,003-50 мг/мл, более

предпочтительно 0,005-2 мг/мл в случае Полисорбата 20 или Полисорбата 80.

Препараты в виде растворов, содержащие антитело, по настоящему изобретению предпочтительно по существу не содержат белки, такие как альбумин сыворотки человека или очищенный желатин, в качестве стабилизаторов.

5 Препараты антитела настоящего изобретения имеют предпочтительно рН 4-8, более предпочтительно 5-7, еще более предпочтительно 6-6,5. Однако рН зависит от содержащегося антитела и не ограничивается этими величинами.

Препараты настоящего изобретения могут дополнительно содержать изотоничные агенты, например полиэтиленгликоль; и сахара, такие как декстран, маннит, сорбит,
10 инозит, глюкоза, фруктоза, лактоза, ксилоза, манноза, мальтоза, сахароза, трегалоза и раффиноза.

Препараты в форме растворов, содержащие антитело, по настоящему изобретению могут дополнительно содержать, если необходимо, разбавители, сольбилизирующие агенты, эксципиенты, рН-модификаторы, успокаивающие агенты, буферы, серосодержащие
15 восстанавливающие агенты, антиоксиданты или тому подобное. Например, серосодержащие восстанавливающие агенты включают N-ацетилцистеин, N-ацетилгомоцистеин, тиоктановую кислоту, тиодигликоль, тиоэтанолламин, тиоглицерин, тиосорбит, тиогликолевую кислоту и ее эфиры, тиосульфат натрия, глутатион и сульфгидрилсодержащие соединения, такие как тиоалкановая кислота, имеющая 1-7
20 атомов углерода. Антиоксиданты включают эриторбовую кислоту, дибутилгидрокситолуол, бутилгидроксианизол, α -токоферол, ацетат токоферола, L-аскорбиновую кислоту и ее соли, L-аскорбилпальмитат, L-аскорбилстеарат, бисульфит натрия, сульфит натрия, триамилгаллат, пропилгаллат, или хелатирующие агенты, такие как динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), пиродифосфат натрия и метафосфат натрия.
25 Могут содержаться также другие обычные добавки, например неорганические соли, такие как хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, фосфат натрия, фосфат калия и бикарбонат натрия; и органические соли, такие как цитрат натрия, цитрат калия и ацетат натрия.

Препараты настоящего изобретения могут быть получены растворением этих
30 компонентов в водном буфере, известном в области препаратов в форме растворов, таком как фосфатный буфер (предпочтительно система моногидрофосфат натрия - дигидрофосфат натрия) и/или цитратный буфер (предпочтительно цитрат-натриевый буфер), и/или ацетатный буфер, для получения препарата в форме раствора. Концентрация буфера обычно составляет 1-500 мМ, предпочтительно 5-100 мМ, более
35 предпочтительно 10-20 мМ.

Препараты в форме растворов, содержащие антитело, по настоящему изобретению обычно вводят парентерально, например инъекцией (т.е. подкожной, внутривенной, внутримышечной или внутривнутрибрюшинной инъекцией), или чрескожно, через слизистую
назально, или внутривнутрилегочно, но можно их ввести также перорально.

40 Препараты в форме растворов, содержащие антитело, по настоящему изобретению обычно помещают в герметизированные и стерилизованные пластиковые или стеклянные контейнеры, имеющие определенный объем, такие как пузырьки, ампулы или шприцы, или контейнеры большого объема, такие как флаконы. С точки зрения удобства предпочтительными являются предварительно заполненные шприцы.

45 Количество антител, содержащихся в препаратах настоящего изобретения, обычно составляет 0,1-200 мг/мл, предпочтительно 1-120 мг/мл, более предпочтительно 2-22,5 мг/мл, в зависимости от типа подвергаемого лечению заболевания, тяжести заболевания, возраста пациента и других факторов.

В препаратах в форме растворов настоящего изобретения образование нерастворимых
50 частиц, особенно во время циклов замораживание/оттаивание, может быть значительно ингибировано и образование нерастворимых веществ во время длительных испытаний на стабильность может быть также заметно ингибировано добавлением поверхностно-активных веществ, как показано в примерах ниже. Обнаружено также, что образование

мультимеров, таких как димеры, а также образование продуктов деградации может быть значительно ингибировано и содержание остающегося мономера антитела может быть повышено добавлением сахаров.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение, однако без ограничения при этом объема изобретения. На основе описания изобретения специалистом в данной области могут быть сделаны различные изменения и модификации, и такие изменения и модификации также включены в настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

Образцы антител

Антитело hPM-1 использовали в качестве гуманизированного антитела против IL-6-рецептора. Антитело hPM-1 было гуманизированным антителом hPM-1, полученным способом, описанным в ссылочном примере 2 JPA HEI 8-99902 с использованием промотора I α фактора элонгации человека, описанного в примере 10 Международной патентной публикации WO92/19759.

Антитело, полученное способом, описанным в ссылочном примере 2 Международной патентной публикации WO98/35698 (называемое далее антителом против HM1.24), использовали в качестве гуманизированного моноклонального антитела против антигена HM1.24.

Антитело hPM-1 и антитело против HM1.24, используемые в нижеследующих примерах, оба являются антителами класса IgG1.

Способы испытаний

(A) Испытания на антителе hPM-1

(1) Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Каждый образец разбавляли подвижной фазой так, чтобы он содержал hPM-1 в количестве, эквивалентном приблизительно 1 мг в 1 мл, и испытывали 30-60 мкл в следующих условиях ВЭЖХ.

Колонка: гель TSK G3000SW_{XL} (TOSOH)

Корпус колонки: защитная колонка TSK SW_{XL} (TOSOH)

Температура колонки: постоянная около 25°C

Подвижная фаза: 50 mM фосфатный буфер (pH 7,0) - 300 mM хлорид натрия

Скорость потока: приблизительно 1,0 мл/мин

Измерение при длине волны: 280 нм.

Площадь пика определяли автоматическим интегрированием для вычисления содержания hPM-1, исходя из площади пика стандартного продукта hPM-1 и процентного содержания оставшегося hPM-1, исходя из первоначальных результатов оценки с использованием следующих уравнений.

$$\text{Содержание hPM-1 (мг/мл)} = \frac{\text{Концентрация стандартного продукта hPM-1} \times \text{Площадь пика испытуемого образца}}{\text{Площадь пика испытуемого образца hPM-1}}$$

$$\text{Процентное содержание (\%)} = \frac{\text{Содержание hPM-1 после термического ускорения}}{\text{Начальное содержание hPM-1}} \times 100$$

Процентные содержания димеров, других мультимеров и продуктов деградации вычисляли по проценту площади с использованием следующего уравнения.

$$\text{Содержание димеров (или других мультимеров или продуктов деградации) (\%)} = \frac{\text{Площадь пика димеров (или других мультимеров или продуктов деградации)}}{\text{Общая площадь пиков}} \times 100$$

(2) Оценка числа нерастворимых частиц автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (HIAC)

Оценку проводили по способу с использованием автоматического счетчика частиц по затемнению света, как описано в разделе Insoluble Particulate Matter Test for Injections, часть General Tests, Processes and Apparatus, фармакопеи Японии.

(3) Автоматизированное визуальное изучение

Автоматизированное визуальное изучение проводили по методу, описанному в разделе Foreign Insoluble Matter Test for Injections, часть of General Tests, Processes and Apparatus, фармакопеи Японии.

Система визуального изучения: тип E422 (Eisai).

5 (В) Испытания на антителе против НМ1.24

(1) Гель-проникающая хроматография (ГПХ); проводили измерения при N = 3 для оценки содержания оставшегося антитела в процентах (%) относительно начального содержания и оценивали также содержание мультимеров и продуктов деградации в процентах.

Колонка: гель TSK G3000SW_{XL} (TOSOH)

10 Корпус колонки: защитная колонка TSK SW_{XL} (TOSOH)

Температура колонки: постоянная, приблизительно 25°C

Подвижная фаза: 50 мМ фосфатный буфер (pH 7,0) - 300 мМ хлорид натрия

Скорость потока: приблизительно 0,5 мл/мин

Измерение при длине волны: 280 нм.

15 Способ вычисления концентрации

$$\text{Содержание антитела против НМ1.24 (мг/мл)} = \frac{\text{Концентрация стандарта} \times \text{Площадь пика антитела против НМ1.24} \times \text{Количество применяемого стандарта}}{\text{общая площадь пика стандарта} \times \text{количество применяемого испытуемого образца}}$$

20

$$\text{Процентное содержание (\%)} = \frac{\text{Содержание антител против НМ1.24 после термического ускорения}}{\text{Начальное содержание антител против НМ1.24}} \times 100$$

Процентное содержание мультимеров и продуктов деградации вычисляли по проценту площади.

25

$$\text{Мультимеры (или продукты деградации) (\%)} = \frac{\text{Площадь пиков мультимеров (или продуктов деградации)}}{\text{Общая площадь пика}} \times 100$$

Пример 1: Влияние добавления поверхностно-активного вещества (1)

30 Испытывали влияние поверхностно-активного вещества (Полисорбата 80) на термостойкость и стабильность при замораживании/оттаивании. Приготовляли образцы, содержащие Полисорбат 80 при различных концентрациях, показанных в таблице 1, и испытывали их следующим образом.

35 (1) Стабильность к действию температуры (ускоренный метод) (50°C - 2W) оценивали по процентному содержанию оставшегося hPM-1 и образованию мультимеров и продуктов деградации, определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

40 (2) Стабильность к действию цикла замораживание/оттаивание (3 цикла хранения при -20°C в течение 3 дней и затем 5°C в течение одного дня) оценивали по процентному содержанию оставшегося hPM-1 и образованию мультимеров и продуктов деградации, определяемым гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

Полученные результаты показаны в таблице 1.

45

Таблица 1				
<Испытуемые образцы и результаты>	Образец	Образец	Образец	Образец
	1	2	3	4
hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	20
Полисорбат 80 (мг/мл)	0	0,25	0,5	0,75
Фосфат натрия (мМ)	15	15	15	15
pH	6,5	6,5	6,5	6,5

50

5	Начальное содержание	hPM-1 (мг/мл)	20,1	20,3	20,3	20,4
		Димеры (%)	0,21	0,22	0,22	0,23
		Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0	0	0	0
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	2	0
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	0
10	Содержание после воздействия температуры (50°C - 2W)	hPM-1 (%)	99,4	98,2	98,1	98,0
		Димеры (%)	1,38	1,39	1,39	1,41
		Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0,91	0,91	0,90	0,90
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	0
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	0
15	Содержание после циклов замораживание/оттаивание (-20°C→5°C, 3 цикла)	hPM-1 (%)	99,7	99,6	99,4	99,3
		Димеры (%)	0,60	0,56	0,52	0,49
		Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0	0	0	0
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	3287	7	1	4
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	539	3	0	0

Было обнаружено, что образование нерастворимых частиц во время циклов замораживание/оттаивание значительно ингибируется добавлением полисорбата. Не обнаружено значительного изменения в стабильности с изменением концентрации Полисорбата 80.

Пример 2: Влияние добавления поверхностно-активного вещества (2)

Испытывали влияние поверхностно-активного вещества (Полисорбата 80) на стабильность к действию цикла замораживание/оттаивание и встряхиванию. Приготовляли образцы, содержащие Полисорбат 80 при различных концентрациях, показанных в таблице 2, и испытывали следующим образом.

Стабильность к действию цикла замораживание/оттаивание (2 цикла хранения при -20°C в течение 8 часов и затем 5°C в течение 8 часов) оценивали по числу нерастворимых частиц на мл, измеряемому автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС). Присутствие или отсутствие нерастворимых веществ оценивали автоматизированным визуальным изучением.

Полученные результаты показаны в таблице 2.

		Образец 5	Образец 6	Образец 7	Образец 8	Образец 9	Образец 10
35	hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	20	20	20
	Полисорбат 80 (мг/мл)	0	0,005	0,05	0,25	0,5	0,75
	Сахароза (мг/мл)	50	50	50	50	50	50
	Фосфат натрия (мМ)	15	15	15	15	15	15
	pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
40	Начальное содержание	Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	10	0	0	0	0
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	2	0	0	0	0
		Нерастворимые вещества	Есть	Нет	Нет	Нет	Нет
45	Содержание после цикла замораживание/оттаивание (-20°C→5°C, 2 цикла)	Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	7020	8	0	0	1
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	601	0	0	0	0
		Нерастворимые вещества	Есть	Есть	Нет	Нет	Нет

Было обнаружено, что образование нерастворимых частиц и нерастворимых веществ во время циклов замораживание/оттаивание существенно ингибируется добавлением Полисорбата 80. Обнаружено, что влияние против образования нерастворимых веществ зависит от концентрации Полисорбата 80.

Пример 3: Влияние добавления сахаров

Испытывали влияние добавления сахаров на стабильность при

замораживании/оттаивании. Приготавливали образцы, содержащие различные сахара, показанные в таблице 3 (сахароза, маннит, трегалоза), и испытывали их на стабильность к циклам замораживание/оттаивание (22 цикла хранения при -20°C в течение 2 часов и затем 5°C в течение 2 часов), на количество образованных димеров определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ).

Таблица 3 <Испытуемые образцы и результаты>						
		Образец 11	Образец 12	Образец 13	Образец 14	Образец 15
hPM-1 (мг/мл)		20	20	20	20	20
Сахароза (мг/мл)		0	50	0	0	0
Маннит (мг/мл)		0	0	50	94	0
Трегалоза (мг/мл)		0	0	0	0	50
Полисорбат 80 (мг/мл)		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Фосфат натрия (мМ)		15	15	15	15	15
pH		6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Начальное содержание	Димеры (%)	0,42	0,43	0,41	0,38	0,42
Содержание после циклов замораживание/ оттаивание (-20°C→5°C, 22 цикла)	Димеры (%)	0,67	0,43	0,89	2,60	0,41

Было обнаружено, что образование димеров ингибируется добавлением сахарозы и трегалозы.

Пример 4: Влияние сахарозы на термостойкость и стабильность к циклу замораживание/оттаивание.

Влияние сахарозы на термостойкость и стабильность к действию цикла замораживание/оттаивание. Приготавливали образцы, содержащие сахарозу при различных концентрациях, показанных в таблице 4, и испытывали их следующим образом.

(1) Стабильность к действию температуры (ускоренный метод: (50°C-2W) оценивали по процентному содержанию оставшегося hPM-1 и образованию мультимеров и продуктов деградации, определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

(2) Стабильность к действию циклов замораживание/оттаивание (3 цикла хранения при -20°C в течение 3 дней и затем 5°C в течение одного дня) оценивали на основании процентного содержания оставшегося hPM-1 и образования мультимеров и продуктов деградации, определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

Полученные результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4 <Испытуемые образцы и результаты>					
		Образец 16	Образец 17	Образец 18	Образец 19
hPM-1 (мг/мл)		20	20	20	20
Сахароза (мг/мл)		0	25	50	100
Полисорбат 80 (мг/мл)		0,5	0,5	0,5	0,5
Фосфат натрия (мМ)		15	15	15	15
pH		6,5	6,5	6,5	6,5
Начальное содержание	hPM-1 (мг/мл)	19,2	19,2	19,3	19,3
	Димеры (%)	0,18	0,16	0,15	0,15
	Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
	Продукты деградации (%)	0	0	0	0
	Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	12	0
	Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	1	0

5	Содержание после воздействия температуры (50°C - 2W)	hPM-1 (%)	98,2	98,5	97,8	97,8
		Димеры (%)	1,37	1,47	1,36	1,41
		Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0,92	0,89	0,89	0,89
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	0
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	0
10	После циклов замораживание/оттаивание (-20°C→5°C, 3 цикла)	hPM-1 (%)	100,2	100,8	100,4	100,2
		Димеры (%)	0,36	0,18	0,17	0,15
		Другие мультимеры (%)	0	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0	0	0	0
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	1	3	5	2
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	1	0	0	0

Было обнаружено, что образование димеров во время циклов замораживание/оттаивание значительно ингибируется добавлением сахарозы. Не обнаружено значительного изменения в стабильности с изменением концентрации сахарозы.

Пример 5: Влияние концентрации антитела

Испытывали влияние концентрации hPM-1 на термостойкость. Приготовляли образцы, содержащие hPM-1 при различных концентрациях, показанных в таблице 5, и испытывали их следующим образом.

Стабильность к действию температуры (ускоренный метод: 50°C-2W) оценивали по процентному содержанию оставшегося hPM-1 и образованию мультимеров и продуктов деградации, определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

Полученные результаты показаны в таблице 5.

		Таблица 5 <Испытуемые образцы и результаты>			
		Образец 20	Образец 21	Образец 22	
hPM-1 (мг/мл)		17,5	20	22,5	
Сахароза (мг/мл)		50	50	50	
Полисорбат 80 (мг/мл)		0,5	0,5	0,5	
Фосфат натрия (мМ)		15	15	15	
pH		6,5	6,5	6,5	
35	Начальное содержание	hPM-1 (мг/мл)	17,0	19,3	21,4
		Димеры (%)	0,16	0,16	0,18
		Другие мультимеры (%)	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0	0	0
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0
Содержание после воздействия температуры (50°C - 2W)		hPM-1 (%)	99,6	100,2	99,8
		Димеры (%)	1,26	1,35	1,45
		Другие мультимеры (%)	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0,95	0,93	0,99
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	3	0
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0

Изменение в стабильности с изменением концентрации hPM-1 не было обнаружено.

Пример 6: Влияние концентрации фосфатного буфера

Было испытано влияние концентрации фосфатного буфера на термостойкость. Приготовляли образцы, содержащие фосфатный буфер при различных концентрациях, показанных в таблице 6, и испытывали их следующим образом.

Стабильность к действию температуры (ускоренный метод: 50°C-2W) оценивали по процентному содержанию оставшегося hPM-1 и образованию мультимеров и продуктов деградации, определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ). Число нерастворимых частиц на мл измеряли автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НИАС).

Полученные результаты показаны в таблице 6.

		Таблица 6 <Испытуемые образцы и результаты>			
		Образец 23	Образец 24	Образец 25	
5	hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	
	Сахароза (мг/мл)	50	50	50	
	Полисорбат 80 (мг/мл)	0,5	0,5	0,5	
	Фосфат натрия (мМ)	10	15	20	
	pH	6,5	6,5	6,5	
10	Начальное содержание	hPM-1 (мг/мл)	19,3	19,4	19,4
		Димеры (%)	0,17	0,18	0,18
		Другие мультимеры (%)	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0	0	0
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0
	Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	
15	Содержание после воздействия температуры (50°C - 2W)	hPM-1 (%)	100,1	99,0	99,2
		Димеры (%)	1,37	1,43	1,45
		Другие мультимеры (%)	0	0	0
		Продукты деградации (%)	0,94	0,95	0,94
		Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0
	Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	0	0	0	

20 Не обнаружено изменение стабильности с изменением концентрации фосфатного буфера.

Пример 7: Влияние добавления сахаров

Испытания термостойкости проводили для оценки влияний добавления сахара (сахарозы и маннита) при концентрации антитела против НМ1.24 в диапазоне 2,5-10 мг/мл. Приготавливали образцы, содержащие сахар при различных концентрациях в препаратах с низким и высоким содержанием антитела против НМ1.24 (1 мл/5 мл в пробирке), и определяли процентное содержание (%) оставшегося антитела, мультимеров (%) и продуктов деградации (%) при различных условиях хранения (60°C-1W, 50°C-3M, 5°C-6M, исходная).

30 Испытуемые препараты с низкой концентрацией антител и результаты показаны в таблицах 7 и 8, тогда как испытуемые препараты с высокой концентрацией антител и результаты показаны в таблицах 9 и 10.

		Таблица 7						
		Образец 26	Образец 27	Образец 28	Образец 29	Образец 30	Образец 31	Образец 32
35	Антитело против НМ1.24 (мг/мл)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Сахароза (мг/мл)	10	50	100	-	-	-	-
	Маннит (мг/мл)	-	-	-	10	50	100	-
	NaCl (мМ)	100	100	100	100	100	100	100
	pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

		Таблица 8		
60°C-1W	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)	
Образец 26	90,9%	5,06%	1,99%	
Образец 27	91,1%	4,60%	1,98%	
Образец 28	90,0%	4,14%	2,05%	
Образец 29	85,5%	5,04%	2,20%	
Образец 30	90,3%	4,99%	1,99%	
Образец 31	86,6%	5,57%	2,63%	
Образец 32	88,9%	5,39%	2,09%	

50°C-3M	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 26	77,0%	14,0%	6,98%
Образец 27	81,5%	13,7%	6,46%
Образец 28	84,9%	12,9%	4,83%
Образец 29	78,9%	14,3%	7,31%
Образец 30	75,2%	13,2%	6,72%
Образец 31	76,1%	12,7%	6,24%
Образец 32	76,8%	15,5%	7,62%

5°С-6М	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 26	103,8%	3,82%	0,00%
Образец 27	104,0%	3,44%	0,00%
Образец 28	104,2%	3,43%	0,00%
Образец 29	103,8%	3,49%	0,00%
Образец 30	104,3%	3,46%	0,00%
Образец 31	104,3%	3,45%	0,00%
Образец 32	103,5%	3,49%	0,00%
Исходная			
Исходная	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 26	100,0%	3,73%	0,00%
Образец 27	100,0%	3,34%	0,00%
Образец 28	100,0%	3,34%	0,00%
Образец 29	100,0%	3,38%	0,00%
Образец 30	100,0%	3,36%	0,00%
Образец 31	100,0%	3,36%	0,00%
Образец 32	100,0%	3,38%	0,00%

После термического воздействия при 50°С-3М образцы демонстрировали повышение в процентном содержании оставшегося антитела и снижение в образовании мультимеров и продуктов деградации способом, зависящим от концентрации добавленной сахарозы. После хранения при 60°С-1W образцы также обнаруживали снижение в количестве образованных мультимеров. При хранении при 50°С-3М влияние добавления сахара на процентное содержание оставшегося антитела было более значительным в случае с сахарозой, чем с маннитом. Влияние добавления сахара на ингибирование ассоциации было обнаружено также с маннитом.

	Образец 33	Образец 34	Образец 35	Образец 36	Образец 37	Образец 38
Антитело против НМ1.24 (мг/мл)	2,5	5,0	5,0	10	10	10
Полисорбат 80 (%)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Ацетат (мМ)	20	20	20	20	20	20
NaCl (мМ)	100	100	100	100	100	100
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Сахароза (мг/мл)	10	10	20	10	40	0

60°С-1W	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 33	96,6%	4,78%	2,16%
Образец 34	96,1%	6,47%	1,84%
Образец 35	96,1%	6,33%	1,84%
Образец 36	96,1%	6,66%	1,76%
Образец 37	97,0%	5,96%	1,75%
Образец 38	95,3%	7,11%	1,82%

50°С-1М	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 33	94,6%	5,01%	2,12%
Образец 34	95,9%	5,62%	2,06%
Образец 35	95,9%	5,27%	2,09%
Образец 36	96,7%	5,37%	1,97%
Образец 37	97,1%	4,95%	1,96%
Образец 38	95,5%	5,69%	2,02%
5°С-6М			
5°С-6М	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 33	107,8%	3,50%	0,00%
Образец 34	106,1%	3,52%	0,00%
Образец 35	106,1%	3,51%	0,00%
Образец 36	104,0%	3,59%	0,00%
Образец 37	104,1%	3,57%	0,00%
Образец 38	103,7%	3,61%	0,00%
Исходная			
Исходная	Содержание (%) оставшегося антитела	Мультимеры (%)	Продукты деградации (%)
Образец 33	100,0%	3,40%	0,00%
Образец 34	100,0%	3,36%	0,00%
Образец 35	100,0%	3,36%	0,00%
Образец 36	100,0%	3,38%	0,00%
Образец 37	100,0%	3,37%	0,00%
Образец 38	100,0%	3,39%	0,00%

Сравнение количеств мультимеров, образованных после воздействия температуры, показало, что ассоциация ингибируется лучше, когда концентрацию добавленной сахарозы увеличивают при одинаковой концентрации антитела против НМ1.24. Было обнаружено, что сахароза также способствует ингибированию ассоциации в препаратах с высокой

5

Пример 8: Влияние добавления сахара

Влияние добавления сахарозы дополнительно испытывали при различных количествах. Образцы, показанные в таблице 11, получали и сохраняли при 50°С-1М, после чего процентное содержание оставшегося мономерного антитела и количество мультимеров

10

Таблица 11				
	Образец 39	Образец 40	Образец 41	Образец 42
Антитело против НМ1.24 (мг/мл)	10	10	10	10
Полисорбат 80 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Ацетат (ммоль/л)	10	10	10	10
NaCl (ммоль/л)	100	100	100	100
pH	6,0	6,0	6,0	6,0
Сахароза (мг/мл)	0	25	50	75

Таблица 12				
	Оставшееся процентное содержание (%)		Мультимеры (%)	
	Начальное	50°С-1М	Начальное	50°С-1М
Образец 39	100,0%	83,3%	3,6%	12,2%
Образец 40	100,0%	86,4%	3,6%	9,7%
Образец 41	100,0%	87,8%	3,5%	8,4%
Образец 42	100,0%	87,2%	3,5%	8,9%

15

20

Обнаружено, что сахароза является эффективной для ингибирования образования мультимеров антитела против НМ1.24.

25

Пример 9: Влияние добавления сахаров (испытание на замораживание/оттаивание)

Испытывали влияние добавления сахаров (невосстанавливающих дисахаридов и восстанавливающих трисахаридов) на стабильность при замораживании/оттаивании.

30

Приготавливали образцы, содержащие сахара, показанные в таблице 13, и подвергали их испытанию на замораживание/оттаивание в следующих условиях.

Стабильность к циклу замораживание/оттаивание оценивали на основании образования димеров (мультимеров), определяемых гель-проникающей хроматографией (ГПХ).

<Условия испытания>

35

Оттаивание: -20°С→5°С (1 час) Выдерживание: 5°С (6 часов)

Замораживание: 5°С→ -20°С (1 час) : -20°С (16 часов)

Вышеуказанный температурный цикл повторяли 3, 7 и 21 раз.

40

Таблица 13					
<Испытуемые образцы и результаты>					
	Образец 43	Образец 44	Образец 45	Образец 46	
hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	20	
Полисорбат 80 (мг/мл)	0,5	0,5	0,5	0,5	
Фосфат натрия (мМ)	15	15	15	15	
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	
Добавка (мМ)	-	Сахароза 145	Трегалоза 145	Раффиноза 145	
Начальное содержание	Димеры (%)	0,4	0,4	0,4	0,4
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	0,4	0,4	0,4	0,4
Содержание после 3 циклов замораживание/оттаивание	Димеры (%)	0,7	0,4	0,5	0,8
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	0,7	0,4	0,5	0,8
Содержание после 7 циклов замораживание/оттаивание	Димеры (%)	0,8	0,5	0,4	1,0
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	0,8	0,5	0,4	1,0

50

Содержание после 21 цикла замораживание/оттаивание	Димеры (%)	1,0	0,4	0,5	1,3
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	1,0	0,4	0,5	1,3
НО = не обнаружено					

5 Эти результаты показали, что образование димеров антитела hPM-1 во время циклов замораживание/оттаивание может быть значительно ингибировано добавлением невосстанавливающих дисахаридов (сахарозы, трегалозы).

Пример 10: Влияние добавления сахаров (испытание на воздействия тепла)

10 Испытывали влияние добавления сахаров (невосстанавливающих дисахаридов и невосстанавливающих трисахаридов) на стабильность во время термического воздействия. Приготовляли образцы, содержащие сахара, показанные в таблице 14 и 15, и подвергали их испытанию на термическое воздействие в следующих условиях.

Стабильность во время термического воздействия оценивали по образованию димеров и мультимеров, определяемому гель-проникающей хроматографией (ГПХ).

15 Таблица 14
<Испытуемые образцы и результаты>

	Образец 47	Образец 48	Образец 49	Образец 50
hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	20
Полисорбат 80 (мг/мл)	0,5	0,5	0,5	0,5
Фосфат натрия (мМ)	15	15	15	15
pH	6,5	6,5	6,5	6,5
Добавка (мМ)	-	Сахароза 145	Трегалоза 145	Раффиноза 145
Исходное содержание	Димеры (%)	0,4	0,4	0,4
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	0,4	0,4	0,4
Содержание после испытания на термическое воздействие 60°C - 14 дней	Димеры (%)	5,2	6,0	5,6
	Другие мультимеры (%)	6,1	4,5	4,5
	Общее количество мультимеров (%)	11,2	10,5	10,0
НО= не обнаружено				

20

25

30

30 Эти результаты показали, что общее содержание мультимеров и образование других мультимеров в препаратах антитела hPM-1 может быть значительно ингибировано добавлением невосстанавливающих дисахаридов (сахароза, трегалоза).

35 Таблица 15

	Образец 51	Образец 52	Образец 53	Образец 54
Антитело против HM1.24 (мг/мл)	10	10	10	10
Полисорбат 80 (мг/мл)	0,25	0,25	0,25	0,25
Ацетат (мМ)	30	30	30	30
pH	6,0	6,0	6,0	6,0
Добавка (мМ)	-	Сахароза 145	Трегалоза 145	Раффиноза 145
Исходное содержание	Димеры (%)	2,8	2,8	2,8
	Другие мультимеры (%)	0,5	0,5	0,5
	Общее количество мультимеров (%)	3,3	3,3	3,3
Содержание после испытания на термическое воздействие 60°C - 14 дней	Димеры (%)	9,2	10,4	9,5
	Другие мультимеры (%)	5,6	2,9	4,1
	Общее количество мультимеров (%)	14,8	13,3	13,6

40

45

50 Обнаружено, что общее содержание мультимеров и образование других мультимеров значительно ингибируется добавлением невосстанавливающих дисахаридов (сахарозы, трегалозы) в препараты антитела против HM1.24 сходным образом с препаратами антитела hPM-1.

Пример 11: Влияние добавления сахаров (ускоренное световое испытание)

Испытывали влияние добавления сахаров (невосстанавливающих дисахаридов и

невосстанавливающих трисахаридов) на стабильность во время светового воздействия. Приготавливали образцы, содержащие сахара, показанные в таблицах 16 и 17, и подвергали их ускоренному световому испытанию в следующих условиях.

Стабильность во время светового воздействия оценивали по образованию димеров и мультимеров, определяемому гель-проникающей хроматографией (ГПХ).

5

Таблица 16 <Испытуемые образцы и результаты>				
	Образец 55	Образец 56	Образец 57	Образец 58
hPM-1 (мг/мл)	20	20	20	20
Полисорбат 80 (мг/мл)	0,5	0,5	0,5	0,5
Фосфат натрия (мМ)	15	15	15	15
pH	6,5	6,5	6,5	6,5
Добавка (мМ)	-	Сахароза 145	Трегалоза 145	Раффиноза 145
Исходное содержание	Димеры (%)	0,4	0,4	0,4
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	0,4	0,4	0,4
Содержание после светового ускорения, 1200000 люксов/час	Димеры (%)	3,5	2,5	3,2
	Другие мультимеры (%)	НО	НО	НО
	Общее количество мультимеров (%)	3,5	2,5	3,2

НО= не обнаружено

20

Обнаружено, что индуцированная светом димеризация антитела hPM-1 может быть значительно ингибирована добавлением сахарозы.

25

Таблица 17 <Испытуемые образцы и результаты>				
	Образец 59	Образец 60	Образец 61	Образец 62
Антитело против HM1.24 (мг/мл)	10	10	10	10
Полисорбат 80 (мг/мл)	0,25	0,25	0,25	0,25
Ацетат (мМ)	30	30	30	30
pH	6,0	6,0	6,0	6,0
Добавка (мМ)	-	Сахароза 145	Трегалоза 145	Раффиноза 145
Исходное содержание	Димеры (%)	2,8	2,8	2,8
	Другие мультимеры (%)	0,5	0,5	0,5
	Общее количество мультимеров (%)	3,3	3,3	3,3
Содержание после испытания на световое ускорение, 1200000 люксов/час	Димеры (%)	3,8	4,1	3,4
	Другие мультимеры (%)	2,8	0,8	2,8
	Общее количество мультимеров (%)	6,6	4,9	6,2

30

35

Обнаружено, что индуцированная светом ассоциация антитела против HM1.24 может быть значительно ингибирована добавлением сахарозы.

40

Пример 12: Влияние добавления разновидностей поверхностно-активных веществ. Проводили испытание на влияние разновидностей поверхностно-активных веществ на стабильность при замораживании/оттаивании. Приготавливали образцы, содержащие поверхностно-активные вещества, показанные в таблице 18, и испытания их проводили следующим образом.

45

Стабильность к действию цикла замораживание/оттаивание (3 цикла замораживание при -25°C/оттаивание при 4°C) оценивали на основании числа частиц на мл, измеряемых автоматическим счетчиком частиц по затемнению света (НІАС).

50

Таблица 18 <Испытуемые образцы и результаты>												
	Образец 63	Образец 64	Образец 65	Образец 66	Образец 67	Образец 68	Образец 69	Образец 70	Образец 71	Образец 72	Образец 73	Образец 74
hPM-1 (мг/мл)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
NaCl (мМ)	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Фосфат натрия (мМ)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0

	Полисорбат 80 (мг/мл)	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0	0	0	0	0	0	0	
	Полисорбат 20 (мг/мл)	0	0	0	0	0	0,01	0,05	0,1	0	0	0	0	
	Полоксамер 188 (мг/мл)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,5	1	2	
5	Замораживание/ оттаивание (- 25°С→4°С, 3 цикла)	Число частиц 10 мкм или больше (частицы/мл)	290	49	22	9	9	14	15	8	7	6	4	5
		Число частиц 25 мкм или больше (частицы/мл)	13	0	1	1	0	2	3	3	2	2	0	2

10 Обнаружено, что образование нерастворимых частиц во время циклов замораживание/оттаивание значительно ингибируется добавлением разновидностей поверхностно-активных веществ (Полисорбат 80, Полисорбат 20, Полоксамер 188).

Формула изобретения

15 1. Стабилизированный раствор, содержащий антитело, включающий сахарозу в качестве стабилизатора, где антителом является антитело против рецептора интерлейкина-6 или антитело против НМ1.24.

2. Раствор по п.1, дополнительно включающий поверхностно-активное вещество в качестве стабилизатора.

20 3. Раствор по п.2, где поверхностно-активным веществом является Полисорбат 80 или 20.

4. Раствор по п.1 или 2, где антитело является рекомбинантным антителом.

5. Раствор по п.1 или 2, где антитело является химерным антителом, гуманизированным антителом или антителом человека.

25 6. Раствор по п.1 или 2, где антитело является антителом класса IgG.

7. Раствор по п.6, где антитело класса IgG является антителом класса IgG1.

8. Способ ингибирования индуцированного светом образования ассоциатов молекул антитела в растворе, содержащем антитело, включающий добавление в раствор сахарозы, где антителом является антитело против рецептора интерлейкина-6 или антитело против НМ1.24.

35

40

45

50