

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 047763

(13) B1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2024.09.06

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 47/02 (2006.01)  
A61K 47/18 (2017.01)

(21) Номер заявки  
202293012

A61K 47/26 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2016.04.15

---

### (54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОМБИНАЦИЮ АНТИ-PD-1 АНТИТЕЛА И ДРУГОГО АНТИТЕЛА

---

(31) 62/149,325; 62/265,268; 62/269,000;  
62/303,855

(56) WO-A1-2013173223  
WO-A1-2014209804

(32) 2015.04.17; 2015.12.09; 2015.12.17;  
2016.03.04

WO-A1-2012135408  
AU-A1-2014240252

(33) US

WANG W., et al., Antibody structure,  
instability, and formulation. J Pharm Sci., 2007, Jan;  
96(1):1-26, doi: 10.1002/jps.20727, c. 8-9, 14-16

(43) 2023.03.31

(62) 201792273; 2016.04.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Садинени Викрам, Цюань Юн,  
Касерер Уоллас (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,  
Костюшенкова М.Ю., Джермакян Р.В.  
(RU)

---

(57) В изобретении предлагаются фармацевтические композиции, которые содержат комбинацию противоракового агента, представляющего собой первое антитело, и второго антитела. В некоторых вариантах осуществления первое антитело представляет собой антитело против белка программируемой гибели 1 (PD-1). В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой лекарственную форму с фиксированным соотношением доз. В определенных вариантах осуществления композицию вводят в постоянной дозе. В изобретении также предлагается набор для лечения субъекта, пораженного заболеванием, при этом набор содержит дозу любой раскрытой здесь композиции и инструкции по применению композиции в любом из раскрытых способов лечения заболевания.

B1

047763

047763  
B1

По всей данной заявке в скобках указаны различные публикации по имени автора и дате, или по номеру патента или номеру патентной публикации. Полное содержание этих публикаций включено в настоящий документ посредством ссылки для более полного описания уровня техники, известного специалистам на дату составления описания и подачи заявки на настоящее изобретение. Кроме того, цитирование ссылки в настоящем документе не должно истолковываться как допущение, что такая ссылка является предшествующим уровнем по отношению к настоящему изобретению.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

Данное изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат комбинацию антитела против иммунных контрольных точек и второго антитела, в виде лекарственной формы с фиксированным соотношением доз.

#### **Сведения о предшествующем уровне техники**

Раковые заболевания человека подвергаются многочисленным генетическим и эпигенетическим изменениям, генерирующими неоантагены, потенциально распознаваемые иммунной системой (Sjoblom et al. (2006) *Science* 314:268-74). Адаптивная иммунная система, состоящая из Т- и В-лимфоцитов, обладает мощным противораковым потенциалом с широкими способностями и превосходной специфичностью в отношении ответа на различные опухолевые антигены. Кроме того, иммунная система демонстрирует значительную гибкость и компонент памяти. Успешное использование всех этих характеристик адаптивной иммунной системы сделает иммунотерапию уникальной среди всех методов лечения рака.

В последнее время несколько ингибиторов контрольных точек иммунного пути начали обеспечивать новые иммунотерапевтические: (i) количество X анти-PD-1 антитела составляет около 240 мг, и количество Y анти-CTLA-4 антитела составляет около 80 мг; (ii) количество X составляет около 80 мг, и количество Y составляет около 80 мг; (iii) количество X составляет около 160 мг, и количество Y составляет около 160 мг; (iv) количество X составляет около 240 мг, и количество Y составляет около 240 мг; или (v) количество X составляет около 80 мг, и количество Y составляет около 240 мг. В определенных вариантах осуществления анти-CTLA4 антитело представляет собой тремелумаб или ипилимумаб.

В другом аспекте второе антитело может представлять собой анти-LAG3 антитело. Соотношение количества X первого антитела (например, анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела) к количеству Y второго антитела (например, анти-LAG-3 антитела) составляет около 12:1, около 3:1 или около 1:1. В конкретном варианте осуществления анти-LAG3 антитело представляет собой BMS-986016.

В других аспектах второе антитело представляет собой анти-CD137 антитело. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества X первого антитела (например, анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела) к количеству Y второго антитела (например, анти-CD-137 антитела) составляет около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:10, около 1:20, около 1:30, около 1:40, около 1:50, около 50:1, около 40:1, около 30:1, около 20:1, около 10:1, около 5:1, около 4:1 или около 2:1. В конкретном варианте осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб.

В некоторых аспектах второе антитело представляет собой анти-KIR антитело. В некоторых вариантах осуществления соотношение количества X первого антитела (например, анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела) к количеству Y второго антитела (например, анти-KIR антитела) составляет около 30:1, около 10:1, около 3:1, около 1:1 или около 1:2. В некоторых вариантах осуществления анти-KIR антитело представляет собой 1-7F9 или лирилумаб.

В определенных аспектах второе антитело может представлять собой анти-GITR антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой MK4166 или TRX518. В других вариантах осуществления соотношение количества X первого антитела (например, анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела) к количеству Y второго антитела (например, анти-GITR антитела) составляет около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:6, около 1:7, около 1:8, около 1:9, около 1:10, около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1.

В других аспектах второе антитело выбрано из группы, состоящей из: анти-TGF $\beta$  антитела, анти-IL-10 антитела, анти-B7-H4 антитела, анти-лиганд Fas антитела, анти-CXCR4 антитела, анти-мезотелин антитела, анти-CD27 антитела, анти-CD73 антитела и любой их комбинации.

Фармацевтическая композиция согласно изобретению, кроме того, может содержать один или несколько дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из: объемообразующего агента, стабилизирующего агента, хелатирующего агента, поверхностно-активного вещества, буферного агента, ионогенного поверхностно-активного вещества и любой их комбинации.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению составлена в одном или нескольких различных буферных агентах. Например, композиция согласно изобретению может быть составлена в Трис-Cl, гистидиновом, цитратном или трис-цитратном буфере. В одном варианте осуществления композиция составлена в Трис-Cl буфере, при этом концентрация Трис-Cl составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В другом варианте осуществления концентрация Трис-Cl составляет около 20 mM. В других вариантах осуществления композиция составлена в цитратном буфере, при этом концентрация цитрата составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В кон-

крайнем варианте осуществления концентрация цитрата составляет около 10 мМ или около 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления композиция составлена в гистидиновом буфере, при этом концентрация гистидина составляет по меньшей мере около 5 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ или около 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидина составляет около 20 мМ. В других вариантах осуществления композиция составлена в трис-цитратном буфере, при этом концентрация Трис-Cl составляет по меньшей мере около 5 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ или около 50 мМ, и концентрация цитрата составляет по меньшей мере около 2 мМ, около 5 мМ, около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, примерно 40 мМ или около 50 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация Трис-Cl составляет около 13,3 мМ, и концентрация цитрата составляет около 6,7 мМ.

Композиция согласно изобретению может иметь pH в интервале примерно от 5 до 8. Например, pH композиции может составлять по меньшей мере около 5, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9 или около 8,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет по меньшей мере около 6,0, около 6,2, около 6,5, около 6,6 или около 7,0.

Композиция, кроме того, может содержать объемообразующий агент. В определенных вариантах осуществления объемообразующий агент выбран из группы, состоящей из NaCl, маннита, глицина, аланина и любой их комбинации.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит стабилизирующий агент. Стабилизирующий агент выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; или любой их комбинации.

В других вариантах осуществления композиция содержит хелатирующий агент. Хелатирующий агент выбран из группы, состоящей из диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), этилендиаминтетрауксусной кислоты, нитрилтриуксусной кислоты и любой их комбинации.

В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20) и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит NaCl при концентрации по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, по меньшей мере около 15 мМ, по меньшей мере около 20 мМ, по меньшей мере около 25 мМ, по меньшей мере около 30 мМ, по меньшей мере около 35 мМ, по меньшей мере около 40 мМ, по меньшей мере около 45 мМ, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, по меньшей мере около 75 мМ, по меньшей мере около 80 мМ, по меньшей мере около 90 мМ, по меньшей мере около 100 мМ, по меньшей мере около 110 мМ, по меньшей мере около 120 мМ, по меньшей мере около 130 мМ, по меньшей мере около 140 мМ, по меньшей мере около 150 мМ, по меньшей мере около 175 мМ, по меньшей мере около 200 мМ, по меньшей мере около 225 мМ, по меньшей мере около 250 мМ, по меньшей мере около 275 мМ, по меньшей мере около 300 мМ, по меньшей мере около 350 мМ, по меньшей мере около 400 мМ, по меньшей мере около 450 мМ или по меньшей мере около 450 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация NaCl составляет около 100 мМ, около 96,15 мМ, около 83,3 мМ, около 78,57 мМ или около 50 мМ.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит маннит (% мас./об.), USP при концентрации по меньшей мере около 0,25%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 0,75%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 2,5%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 3,5%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 4,5%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 7,5% или по меньшей мере около 10%. В некоторых вариантах осуществления концентрация маннита составляет около 1%, около 1,15%, около 1,67%, около 1,86% или около 3%.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит DTPA, USP при концентрации по меньшей мере около 5 мкМ, по меньшей мере около 10 мкМ, по меньшей мере около 15 мкМ, по меньшей мере около 20 мкМ, по меньшей мере около 25 мкМ, по меньшей мере около 30 мкМ, по меньшей мере около 40 мкМ, по меньшей мере около 50 мкМ, по меньшей мере около 60 мкМ, по меньшей мере около 70 мкМ, по меньшей мере около 75 мкМ, по меньшей мере около 80 мкМ, по меньшей мере около 90 мкМ, по меньшей мере около 100 мкМ, по меньшей мере около 110 мкМ, по меньшей мере около 120 мкМ, по меньшей мере около 130 мкМ, по меньшей мере около 140 мкМ, по меньшей мере около 150 мкМ, по меньшей мере около 175 мкМ или по меньшей мере около 200 мкМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация DTPA составляет около 20 мкМ, около 50 мкМ, около 65,71 мкМ, около 73,3 мкМ, около 93,85 мкМ или 100 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит PS80 (%мас./об.) при концентрации по меньшей мере около 0,005%, по меньшей мере около 0,01%, по меньшей мере около 0,015%, по меньшей мере около 0,02%, по меньшей мере около 0,03%, по меньшей мере около 0,04%, по меньшей мере около 0,05%, по меньшей мере около 0,06%, по меньшей мере около 0,07%, по меньшей мере около

0,08%, по меньшей мере около 0,09% или по меньшей мере около 0,1%. В некоторых вариантах осуществления концентрация PS80 составляет около 0,01%, около 0,012%, около 0,013%, около 0,02%, около 0,23%, около 0,04% или около 0,05%.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит сахарозу (%мас./об.) при концентрации по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 4,5%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 5,5%, по меньшей мере около 6%, по меньшей мере около 6,5%, по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 7,5%, по меньшей мере около 8%, по меньшей мере около 8,5%, по меньшей мере около 9%, по меньшей мере около 9,5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 12% или по меньшей мере около 15%. В некоторых вариантах осуществления концентрация сахарозы составляет около от 6% до 8,5%.

В определенных вариантах осуществления изобретение включает следующие композиции: (i) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в буфере, содержащем 13,3 mM Трис, около 6,7 mM цитрата, около 1,67% маннита, около 83,3 mM NaCl, около 73,3 мкМ DTPA и около 0,013% PS80 при pH около 6,2; (ii) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в трис-цитратном буфере, содержащем около 1,15% маннита, около 96,15 mM NaCl, около 93,85 мкМ DTPA и около 0,012% PS80 при pH около 6,6; (iii) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:3 в трис-цитратном буфере, содержащем около 1,86% маннита, около 78,57 mM NaCl, около 65,71 мкМ DTPA и около 0,023% PS80 при pH около 6,0; (iv) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в 20 mM гистидиновом буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 50 мкМ DTPA, около 6% сахарозы и около 0,05% PS80 при pH около 6; (v) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в примерно 20 mM гистидиновом буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 50 мкМ DTPA, около 6% сахарозы и около 0,05% PS80 при pH около 7; (vi) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в примерно 20 mM гистидиновом буфере, содержащем около 50 мкМ DTPA, около 8,5% сахарозы и около 0,05% PS80 при pH около 6; (vii) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 50 мкМ DTPA, около 6% сахарозы и около 0,05% PS80 при pH около 6; (viii) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 3:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 20 мкМ DTPA, около 3% маннита и около 0,04% PS80 при pH около 6; (ix) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 100 мкМ DTPA, около 3% маннита и около 0,02% PS80 при pH около 6; (x) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 100 мкМ DTPA, около 3% маннита и около 0,02% PS80 при pH около 6,5; (xi) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 100 mM NaCl, около 100 мкМ DTPA, около 1,0% маннита и около 0,02% PS80 при pH около 6,5; или (xii) фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 mM цитратном буфере, содержащем около 50 mM NaCl, около 100 мкМ DTPA, около 6% сахарозы и около 0,02% PS80 при pH около 6,0.

В других вариантах осуществления изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:3, содержащую около 4,62 mg/ml ниволумаба, около 1,54 mg/ml ипилимумаба, около 18,5 mM трис-гидрохлорида, около 1,5 mM дигидрата цитрата натрия, около 96,2 mM NaCl, около 1,2% маннита, около 93,9 мкМ пентетовой кислоты и около 0,012% PS80 при pH около 6,0, или фармацевтическую композицию, содержащую ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:3, содержащую около 4,61 mg/ml ниволумаба, около 1,54 mg/ml ипилимумаба, около 18,46 mM трис-гидрохлорида, около 1,54 mM дигидрата цитрата натрия, около 96,15 mM NaCl, около 1,15% маннита, около 93,85 мкМ пентетовой кислоты и около 0,012% PS80 при pH около 6,3.

Композиция согласно изобретению после составления может оставаться стабильной и храниться при температуре около 5°C в течение по меньшей мере примерно 1 недели, по меньшей мере примерно 2 недель, по меньшей мере примерно 1 месяца, по меньшей мере примерно 2 месяцев, по меньшей мере примерно 3 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере около 1 года, по меньшей мере примерно 2 лет или по меньшей мере примерно 5 лет. В некоторых вариантах осуществления композиция остается стабильной и может храниться при температуре около 40°C в течение по меньшей мере примерно 1 недели, по меньшей мере примерно 2 недель, по меньшей мере примерно 1 месяца, по меньшей мере примерно 2 месяцев, по меньшей мере примерно 3 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 1 года, по меньшей мере примерно 2 лет или по меньшей мере примерно 5 лет. В других вариантах осуществления композиция остается стабильной и может храниться при температуре около 25°C в течение по меньшей мере примерно 1 недели, по меньшей мере примерно 2 недель, по меньшей мере примерно 1 месяца, по меньшей мере примерно 2 месяцев, по меньшей мере примерно 3 месяцев, по



для инъекций, USP или 5% раствором декстрозы для инъекции, USP. В некоторых вариантах осуществления композицию разбавляют для получения желаемой концентрации первого и второго антитела.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагается набор, содержащий композицию, раскрытую в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предлагается способ изготовления композиции, раскрытый в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму, содержащую лекарственный препарат на основе анти-PD-1 антитела, смешивают с лекарственной формой, содержащей лекарственный препарат на основе второго антитела, для получения желательного соотношения в конечном лекарственном препарате без замен буферов. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму, содержащую фармацевтическую субстанцию на основе анти-PD-1 антитела, и лекарственную форму, содержащую фармацевтическую субстанцию на основе второго антитела, подвергают заменам буферов и/или концентрированию перед смешиванием для получения желательного соотношения в конечном лекарственном препарате.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу модулирования иммунного ответа у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение композиции, раскрытой здесь, пациенту.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу введения двух антител в одно и то же время пациенту, нуждающемуся в этом, включающему введение пациенту композиции, раскрытой здесь, при этом антитела способны лечить по меньшей мере одно заболевание или патологическое состояние.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания или патологического состояния, включающему введение пациенту раскрытой здесь композиции.

В некоторых вариантах осуществления заболевания или состояние представляет собой инфекционное заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутрглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичника, рак тельный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, карциному фалlopиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, аниогенез опухоли, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные условиями окружающей среды раковые заболевания, включая раковые заболевания, индуцированные асбестом, и любые комбинации указанных типов рака.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композицию разбавляют перед введением. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в постоянной дозе. В некоторых вариантах осуществления количество первого антитела и количеству второго антитела, вводимое пациенту в виде однократной дозы, идентично количеству X и количеству Y, соответственно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в дозе на основе массы тела. В некоторых вариантах осуществления количество вводимого пациенту первого антитела составляет по меньшей мере около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 1,5 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг или около 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления количества вводимого пациенту первого антитела составляет по меньшей мере около 1 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят по меньшей мере один раз в неделю, по меньшей мере два раза в неделю, по меньшей мере каждые две недели, по меньшей мере каждые три недели или по меньшей мере один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления введение продолжают в течение по меньшей мере примерно 8 недель, по меньшей мере примерно 12 недель, по меньшей мере примерно 3 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 1 год, по меньшей мере примерно 18 месяцев, по меньшей мере примерно 2 лет или более 2 лет. В некоторых вариантах осуществления для лечения пациента также применяют другой противораковый агент. Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны композиции лекарственных форм, содержащих фармацевтические субстанции (DS) и лекарственные препараты (DP) на основе анти-CTLA4 антитела (то есть ипилимумаб) и анти-PD-1 антитела (то есть ниволумаб).

На фиг. 2А показаны результаты эксклюзионной хроматографии (SEC) объединенной лекарственной формы, содержащей комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:1 (FDRC=комбинация с фиксированным соотношением доз) анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела

(например, ипилимумаб). На фиг. 2В показаны результаты анализов методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF) объединенной лекарственной формы, содержащей комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:1 (FDRC= комбинация с фиксированным соотношением доз) анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела (например, ипилимумаб). ЕС обозначает смесь трис- и цитратного буферов. Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба представлены в качестве контролей; и комбинация анти-PD-1 антитела и анти-CTLA4 антитела (например, ниволумаб и ипилимумаб) показана в виде ЕС FDRC на фиг. 2А, В. На фиг. 2А показано фактическое изменение размера высокомолекулярного (HMW) пика (%) в лекарственных формах, хранящихся в течение 3 месяцев при 40°C, по сравнению с контролями на день-0. Отрегулированный уровень pH при 25°C, а также концентрации полисорбата 80 (PS80), NaCl и маннита для каждого прототипа лекарственной формы показаны под осью x на фиг. 2А. На фиг. 2В показано фактическое изменение размера кислотного пика (%) ниволумаба и ипилимумаба в лекарственных формах, хранящихся в течение 6 месяцев при 5°C, по сравнению с контролями на день-0. Отрегулированный уровень pH при 25°C, а также концентрации NaCl и маннита для каждой лекарственной формы показаны под осью x на фиг. 2В. Экспериментальные точки обозначены как N (ниволумаб), С (комбинация ниволумаба и ипилимумаба) и I (ипилимумаб) на фиг. 2А, В.

На 3А, В показаны результаты анализов методом SEC лекарственных форм, содержащих комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела (например, ипилимумаб). Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба представлены в качестве контролей; и комбинация анти-PD-1 антитела и анти-CTLA4 антитела (например, ниволумаб и ипилимумаб) показана в виде ЕС (3А, В). На фиг. 3А показан размер HMW пика (%) на день-0 (Исходный), размер HMW пика через 2 месяца хранения при 40°C, и изменение размера HMW пика между контролем на день-0 и лекарственной формой через 2 месяца хранения при 40°C для каждого образца и прототипа лекарственной формы (ЕС: pH 6,0 (1 ипилимумаб:3 ниволумаб); ЕС: pH 6,2 (1 ипилимумаб:1 ниволумаб); и ЕС: pH 6,6 (3 ипилимумаб:1 ниволумаб)). На фиг. 3В показан размер LMW пика (%) на день-0 (Исходный), размер LMW пика через 2 месяца хранения при 40°C, изменение размера LMW пика между контролем на день-0 и каждой лекарственной формой после хранения в течение 2 месяцев при 40°C, и изменение размера LMW пика между контролем на день-0 и каждой лекарственной формой после хранения в течение 3 месяцев при 25°C. Отрегулированный уровень pH при 25°C, концентрация ипилимумаба, концентрация ниволумаба, PS80 и NaCl для каждой лекарственной формы показаны под осью x (3А, В).

На фиг. 4А-С показаны результаты анализа методом cIEF лекарственных форм, содержащих комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела (например, ипилимумаб) после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4А), 3 месяцев при 5°C (фиг. 4В) и 1 месяца при 25°C (фиг. 4С). Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей (фиг. 4А-С). Фактические различия в размерах кислотных пиков (%) ниволумаба (N) и ипилимумаба (I) в выбранные моменты времени относительно контролей на день-0 показаны для контролей и каждого прототипа лекарственной формы (ЕС: pH 6,0 (1 ипилимумаб:3 ниволумаб); ЕС: pH 6,2 (1 ипилимумаб:1 ниволумаб); и ЕС: pH 6,6 (3 ипилимумаб:3 ниволумаб)) (фиг. 4А-С). Теоретическое значение pH при 25°C, тип буфера и соотношение ипилимумаба к ниволумабу для каждой лекарственной формы показаны под осью x на фиг. 4А-В; и концентрация NaCl, теоретическое значение pH при 25°C и соотношение ипилимумаба к ниволумабу для каждой лекарственной формы показаны под осью x на фиг. 4С. Теоретическое значение pH эквивалентно значению pH в исследовании стабильности (фиг. 4А-С).

На 5А, В показаны результаты анализов методом SEC (фиг. 5А) и cIEF (фиг. 5В) новых, разработанных с применением планирования экспериментов (Design-of-Experiment, DoE) лекарственных форм, содержащих комбинацию с фиксированным соотношением доз 3:1 анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA4 антитела (например, ипилимумаб). Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей (5А, В). На фиг. 5А показан размер HMW пика (%) на день-0 (Исходный), размер HMW пика через 3 месяца хранения при 40°C, изменение размера HMW пика между контролем на день-0 и лекарственной формой после хранения в течение 3 месяцев при 40°C, и изменение размера HMW пика между контролем на день-0 и лекарственной формой после хранения в течение 3 месяцев при 25°C для контрольных лекарственных форм и каждого прототипа лекарственной формы (Combo New, Combo 4, Combo 5, Combo 6 и Combo 8). На фиг. 5В показаны фактические различия в размерах кислотных пиков (%) ниволумаба (N) и ипилимумаба (I) относительно контролей на день-0 для каждого прототипа лекарственной формы после хранения в течение 3 месяцев при 25°C. Соотношение ипилимумаба к ниволумабу; концентрации NaCl, маннита и сахарозы; теоретические значения pH при 25°C и тип буфера для каждой лекарственной формы показаны под осями x (5А, В).

На 6А, В показаны результаты анализов методом SEC лекарственных форм на объединенной платформе (platform combined, PC), содержащих комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:1; 1:3 или 3:1 анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела (например, ипилимумаб), после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6А) и 3 месяцев при 5°C (фиг. 6В). Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей (6А, В). На фиг. 6А показано факти-

ческое изменение размера HMW пика (%) между контролями на день-0 и каждым контролем и прототипом лекарственной формы (PC: pH 6,0-1:1; PC: pH 5,5-1:3; PC: pH 6,0-1:3; PC: pH 6,5-1:3; и PC: pH 6,0-3:1) после хранения в течение 3 месяцев при 40°C. На фиг. 6В показан размер HMW пика (%) на день 0 (Исходный) и размер HMW пика через 3 месяца хранения при 5°C для каждой лекарственной формы. Тип буфера и соотношение ипилимумаба к ниволумабу для каждой лекарственной формы показаны под осью x (6A, В).

На 7А, В показаны результаты анализов методом сIEF лекарственных форм на объединенной платформе (PC), содержащих комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:1; 1:3 или 3:1 анти-PD-1 антитела (например, ниволумаб) и анти-CTLA-4 антитела (например, ипилимумаб), после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7А) и 3 месяцев при 5°C (фиг. 7В). Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей (7А, В). На фиг. 7А показаны фактические различия в размерах кислотных пиков (%) ниволумаба (N) и ипилимумаба (I) относительно контролей на день-0 для каждого контроля и прототипа лекарственной формы (PC: pH 6,0-1:1; PC: pH 5,5-1:3; PC: pH 6,0-1:3; PC: pH 6,5-1:3; и PC: pH 6,0-3:1) после хранения в течение 3 месяцев при 25°C. На фиг. 7В показаны фактические различия в размерах кислотных пиков (%) ниволумаба (N) и ипилимумаба (I) относительно контролей на день-0 для каждой лекарственной формы после хранения в течение 3 месяцев при 5°C. Тип буфера и соотношение ипилимумаба к ниволумабу для каждой лекарственной формы показаны под осью x (7А, В).

На фиг. 8 показаны результаты анализов методом SEC лекарственных форм, содержащих FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба, после хранения в течение 1 месяца при 40°C. Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей (фиг. 8). Фактическое изменение размера HMW пика (%) между контролями на день-0 и лекарственными формами после хранения в течение 1 месяца при 40°C показано для каждого контроля и прототипа лекарственной формы (A, B, C и D) (фиг. 8). Соотношение ипилимумаба к ниволумабу, тип буфера и теоретическое отрегулированное значение pH для каждой лекарственной формы показаны под осью x (фиг. 8).

На фиг. 9 показаны результаты анализов методом сIEF лекарственных форм, содержащих FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C. Результаты для DP ниволумаба и DP ипилимумаба показаны в качестве контролей. На фиг. 9 показаны фактические различия в размерах кислотных пиков (%) ниволумаба (N) и ипилимумаба (I) относительно контролей на день-0 для каждого контроля и прототипа лекарственной формы (A, B, C и D) после хранения в течение 3 месяцев при 25°C. Соотношение ипилимумаба к ниволумабу, тип буфера и теоретическое отрегулированное значение pH для каждой лекарственной формы показаны под осью x.

На фиг. 10 показана скорость деградации ипилимумаба, оцененная по изменению площади кислотного пика, в FDRC и коммерческой композиции при 25°C/60% RH (относительная влажность). Композиция FDRC показана в табл. 7.

На фиг. 11 показана скорость деградации ниволумаба, оцененная по изменению площади кислотного пика, в FDRC и коммерческой композиции при 25°C/60% RH (относительная влажность). Композиция FDRC показана в табл. 7.

На фиг. 12 показан профиль кислотного пика при 25°C для ипилимумаба и ниволумаба в исследовании при различных значениях pH.

На фиг. 13 показан высокомолекулярный профиль эксклюзионной хроматографии прототипов DP в исследовании устойчивости. HMW профиль DP FDRC оставался без изменений через 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C.

На фиг. 14 показан профиль эксклюзионной хроматографии мономера DP FDRC через 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C.

На фиг. 15 показан профиль кислотного пика ипилимумаба. В ходе оценки была установлена зависимость дезамидирования от pH при повышенной температуре, равной 25°C, на что указывает увеличение профиля кислотного пика в диапазоне более высоких температур при pH 7,0.

На фиг. 16 показан профиль кислотного пика ниволумаба. В ходе оценки была установлена зависимость дезамидирования от pH при повышенной температуре, равной 25°C, на что указывает увеличение профиля кислотного пика в диапазоне более высоких температур при pH 7,0.

На фиг. 17 показан профиль главного пика ипилимумаба. В ходе оценки была установлена зависимость дезамидирования от pH при повышенной температуре, равной 25°C, на что указывает увеличение профиля кислотного пика в диапазоне более высоких температур при pH 7,0.

На фиг. 18 показан профиль главного пика ниволумаба. В ходе оценки была установлена зависимость дезамидирования от pH при повышенной температуре, равной 25°C, на что указывает увеличение профиля кислотного пика в диапазоне более высоких температур при pH 7,0.

На фиг. 19 показано влияние pH на профиль сIEF.

На фиг. 20 показан профиль iCIEF в диапазоне pH 5,4-6,6.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим анти-PD-1 антитело и второе антитело. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой лекарственную форму, содержащую комбинацию с фиксированной комбинацией доз. Преимущества такой

композиции, представляющей собой единую лекарственную форму, содержащую комбинацию с фиксированной комбинацией доз, могут включать повышенную приверженность лечению за счет сокращения времени проведения лечения (для заданной композиции, например, внутривенного введения) или сокращения количества введений (например, многократных внутривенных (i.v.) инъекций), и возможность получения объединенного профиля для обоих лекарственных средств. Однако такая композиция, представляющая собой единую лекарственную форму с фиксированной комбинацией доз, может вызывать нежелательные взаимодействия между двумя антителами, уменьшая тем самым общее количество активного ингредиента, а также ограничивать возможности терапевта в отношении подбора доз.

#### Термины.

Для облегчения понимания настоящего изобретения вначале необходимо определить некоторые термины. Как используется в данной заявке, за исключением случаев, явно оговоренных в настоящем документе, каждый из следующих терминов будет иметь значение, указанное ниже. Дополнительные определения содержатся в описании.

Используемый здесь термин "и/или" следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, термин "и/или", используемый в выражении, таком как "A и/или B" в настоящем документе, понимается как включающий "A и B", "A или B", "A" (только) и "B" (только). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в выражении, таком как "A, B и/или C", понимается как охватывающий каждый из следующих аспектов: A, B и C; A, B или C; A или B; B или C; A и C; A и B; B и C; A (только); B (только); и C (только).

Подразумевается, что там, где аспекты описаны в настоящем документе с помощью термина "содержащий", также предусматриваются другие аналогичные аспекты, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий в основном из".

Если не указано иначе, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют те же самые значения, что и обычно подразумеваемые специалистом в данной области, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2<sup>nd</sup> ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press обеспечивают специалиста в данной области общим словарем по многим терминам, использованным в данном изобретении.

Единицы измерения, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме согласно Международной системе единиц (СИ) (Système International de Unites, SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Заглавные буквы, представленные здесь, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть сделаны со ссылкой на описание в целом. Таким образом, термины, определенные далее, более полно определяются ссылкой на описание в целом.

"Введение" относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей терапевтический агент, с использованием различных способов и систем доставки, известных специалисту в данной области. Предпочтительные пути введения описанных здесь лекарственных форм включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, интраперитонеальный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемое здесь выражение "парентеральное введение" означает способы введения, отличающиеся от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, внутриглазничную, внутрисердечную, интрадермальную, интраперитонеальную, транстрехеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму вводят непарентеральным путем, предпочтительно перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение может быть также выполнено, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

"Нежелательное явление" (AE), используемое здесь, представляет собой любой неблагоприятный и обычно непредусмотренный или нежелательный признак (включая отклонение лабораторного показателя от нормы), симптом или заболевание, связанное с применением терапевтического лечения. Например, нежелательное явление может быть связано с активацией иммунной системы или размножением клеток иммунной системы (например, Т-клеток) в ответ на лечение. Терапевтическое лечение может вызывать одно или несколько ассоциированных нежелательных явлений, и каждое нежелательное явление может иметь одинаковый или различный уровень тяжести. Ссылка на способы, способные "изменить нежелательные явления", означает режим лечения, который уменьшает число случаев возникновения и/или тяжесть одного или нескольких нежелательных явлений, ассоциированных с применением другого режима лечения.

"Антитело" (Ab) будет включать, без ограничения, гликопротеин иммуноглобулин, который специфически связывается с антигеном и содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L)

цепи, взаимосвязанные дисульфидными связями, или его антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая (H) цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании как  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех константных доменов,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращено называемой в данном описании как  $V_L$ ) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного константного домена,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$ , могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), разбросанные между областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями хозяина или факторами, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Иммуноглобулин может происходить из любого из общеизвестных изотипов, включающих в качестве неограничивающих примеров IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают в качестве неограничивающих примеров человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. "Изотип" относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. В качестве примера, термин "антитело" включает природные и неприродные антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела; и одноцепочечные антитела. Нечеловеческие антитела можно гуманизировать рекомбинантными способами для уменьшения их иммуногенности у человека. Если не указано иначе и если контекст не диктует иного, термин "антитело" также включает антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающую часть любого из вышеуказанных иммуноглобулинов, и включает моновалентный и двухвалентный фрагмент или часть, и одноцепочечное антитело.

Термин "моноклональное антитело" ("mAb") применяют для описания неприродного препарата молекул антител единственной молекулярной композиции, то есть молекул антител, чьи первичные последовательности по существу идентичны и которые проявляют одинаковую специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Моноклональное антитело (mAb) является примером выделенного антитела. Моноклональные антитела (mAb) можно получать с использованием гибридомы, рекомбинантными, трансгенным или другими известными специалистам в данной области способами.

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если данное антитело содержит константную область, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro*, или соматическая мутация *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело", используемое здесь, не включает антитела, в которых CDR-последовательности, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются в качестве синонимов.

"Гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты вне областей CDR нечеловеческого антитела заменены на соответствующие аминокислоты, полученные из человеческих иммуноглобулинов. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне областей CDR заменены на аминокислоты, полученные из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в одной или нескольких областях CDR не изменены. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми до тех пор, пока они не лишают антитела способности связываться с данным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет сходную с первоначальным антителом антигеннную специфичность.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором последовательности вариабельной области получены из одних видов, и последовательности константной области получены из других видов, такому как антитело, в котором последовательности вариабельной области получены из мышного антитела, и последовательности константной области получены из антитела человека.

"Анти-антиген" антитело относится к антителу, которое связывается специфически с антигеном. Например, анти-PD-1 антитело специфически связывается с PD-1, и анти-CTLA-4 антитело специфически связывается с CTLA-4.

"Антигенсвязывающая часть" антитела (также называемая как "антигенсвязывающий фрагмент") относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом.

"Рак" относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое клеточное деление и рост приводят к образованию злокачественных опухолей, которые инвазируют соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. "Рак" или "раковая ткань" может включать опухоль.

"CD137", "CD-137", "член 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF9)", "4-1BB" и "индуцированный активацией лимфоцитов (ILA)", все относятся к одному и тому же члену семейства рецепторов фактора некроза опухолей. Одна активность CD137 связана с костимулирующей активностью для активированных Т-клеток. (Jang et al. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 242 (3): 613-20). Термин "CD137", используемый здесь, включает CD137 человека (hCTLA-4), варианты, изоформы и видовые гомологи hCD137, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпигенотип с hCD137. Аминокислотная последовательность hCD137 может быть найдена под номером доступа GenBank NP\_001552.

"Антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов" (CTLA-4) относится к иммуноингибиющему рецептору, принадлежащему семейству CD28. CTLA-4 экспрессируется исключительно на Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами, CD80 и CD86 (также называемыми B7-1 и B7-2, соответственно). Термин "CTLA-4", используемый здесь, включает CTLA-4 человека (hCTLA-4), варианты, изоформы и видовые гомологи hCTLA-4, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпигенотип с hCTLA-4. Полная последовательность hCTLA-4 может быть найдена под номером доступа GenBankNo. AAB59385.

"Заболевание" относится к любому нарушению структуры или функции в организме, например, человека, которое не является прямым результатом физической травмы. "Инфекционное заболевание" представляет собой заболевание, которое вызвано организмом, таким как бактерия, гриб, паразит, вирус или другой патоген.

"Интервал дозирования", используемый здесь, означает количество времени между введением субъекту многократных доз лекарственной формы, описанной в настоящем документе. Интервал дозирования может, таким образом, быть указан в виде диапазонов.

Используемый здесь термин "частота дозирования" относится к частоте введения доз лекарственной формы, описанной здесь, в заданное время. Частота дозирования может быть указана в виде количества доз на заданное время, например, один раз в неделю или один раз в две недели.

Использование термина "фиксированная доза" в отношении композиции согласно изобретению означает, что два или более различных антитела в единой композиции присутствуют в конкретных (фиксированных) соотношениях относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза основана на массе (например, мг) антител. В определенных вариантах осуществления фиксированная доза основана на концентрации (например, мг/мл) антител. В некоторых вариантах осуществления соотношение составляет по меньшей мере около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:6, около 1:7, около 1:8, около 1:9, около 1:10, около 1:15, около 1:20, около 1:30, около 1:40, около 1:50, около 1:60, около 1:70, около 1:80, около 1:90, около 1:100, около 1:120, около 1:140, около 1:160, около 1:180, около 1:200, около 200:1, около 180:1, около 160:1, около 140:1, около 120:1, около 100:1, около 90:1, около 80:1, около 70:1, около 60:1, около 50:1, около 40:1, около 30:1, около 20:1, около 15:1, около 10:1, около 9:1, около 8:1, около 7:1, около 6:1, около 5:1, около 4:1, около 3:1 или около 2:1 мг первого антитела к мг второго антитела. Например, соотношение 3:1 первого антитела и второго антитела может означать, что флакон может содержать около 240 мг первого антитела и 80 мг второго антитела или около 3 мг/мл первого антитела и 1 мг/мл второго антитела.

Используемый термин "постоянная доза" в отношении композиции согласно изобретению означает дозу, которую вводят пациенту независимо от массы или площади поверхности тела (BSA) пациента. Поэтому постоянную дозу не приводят в виде дозы в мг/кг, а указывают в виде абсолютного количества агента (например, анти-CTLA4 антитела и/или анти-PD-1 антитела). Например, пациент с массой тела 60 кг и пациент с массой тела 100 кг будут получать одинаковую дозу композиции (например, 240 мг анти-PD-1 антитела и 80 мг анти-CTLA4 антитела, представленные в одном флаконе, содержащем лекарственную форму с фиксированной комбинацией доз, то есть 240 мг анти-PD-1 антитела и 80 мг анти-CTLA4 антитела (или в двух флаконах, содержащих лекарственную форму с фиксированной комбинацией доз, то есть 120 мг анти-PD-1 антитела и 40 мг анти-CTLA4 антитела, и т.д.)).

Используемый здесь термин "доза на основе массы тела", означает, что доза, которую вводят пациенту, рассчитывается на основе массы тела пациента. Например, когда пациенту с массой тела 60 кг требуется 3 мг/кг анти-PD-1 антитела в комбинации с 1 мг/кг анти-CTLA4 антитела, можно рассчитать соответствующие количества анти-PD-1 антитела (то есть 180 мг) и анти-CTLA4 антитела (то есть 60 мг) из лекарственной формы с фиксированной комбинацией доз в соотношении 3:1 анти-PD-1 антитела и анти-CTLA4 антитела.

Используемый здесь термин "референсная композиция" относится к композиции, содержащей либо первое антитело, либо второе антитело, но не оба антитела. Референсная композиция может содержать такие же компоненты, как композиция, содержащая первое антитело и второе антитело, за исключением того, что присутствует только одно антитело. В других вариантах осуществления референсная компози-

ция представляет собой коммерчески доступную соответствующую композицию, например, OPDIVO® или KEYRUDA® для анти-PD-1 антитела, или YERVOY® для анти-CTLA-4 антитела.

Термины "GITR", "представитель 18 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли", "индуцируемый при активации рецептор семейства TNFR" или "индуцируемый глюкокортикоидами TNFR-родственный белок" относятся к белку, который является членом суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли. У человека GITR кодируется геном TNFRSF18. Он представляет собой трансмембранный белок типа I, состоящий из 241 аминокислоты, характеризующийся тремя богатыми цистеином псевдовторами во внеклеточном домене и, в частности, защищает индуцированный Т-клеточным рецептором апоптоз, но не защищает клетки от других апоптотических сигналов, включая запуск через Fas, лечение дексаметазоном или УФ-облучение (Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-622). Используемый здесь термин "GITR" включает GITR (hGITR) человека, варианты, изоформы и видовые гомологи hGITR, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпипот с hGITR. Идентифицировано три изоформы hGITR, все из которых содержат одинаковый внеклеточный домен, за исключением его С-концевой части. Вариант 1 (номер доступа NP\_004186) состоит из 241 аминокислоты и представляет самый длинный транскрипт. Он содержит дополнительный кодирующий сегмент, что приводит к сдвигу рамки по сравнению с вариантом 2. Полученный белок (изоформа 1) содержит отличающийся и более короткий С-конец по сравнению с изоформой 2. Вариант 2 (номер доступа NP\_683699) кодирует самый длинный белок (изоформа 2), состоящий из 255 аминокислот, и является растворимым. Вариант 3 (номер доступа NP\_683700) содержит дополнительный кодирующий сегмент, что приводит к сдвигу рамки, по сравнению с вариантом 2. Полученный белок (изоформа 3) содержит отличающийся и более короткий С-конец по сравнению с изоформой 2, и состоит из 234 аминокислот.

Термин "иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного или имеющего риск заражения, или страдающего повторным возникновением заболевания, с помощью способа, включающего индукцию, усиление, подавление или иное модификация иммунного ответа.

Термин "LAG3", "LAG-3" или "ген активации лимфоцитов 3" относится к гену активации лимфоцитов 3. Используемый здесь термин LAG-3 включает LAG-3 (hLAG-3) человека, варианты, изоформы и видовые гомологи hLAG-3, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпипот с hLAG-3. Термин "LAG-3 человека" относится к последовательности LAG-3 человека, такой как полная аминокислотная последовательность LAG-3 человека, имеющая код доступа в Genbank NP\_002277. Термин "LAG-3 мыши" относится к последовательности LAG-3 мыши, такой как полная аминокислотная последовательность LAG-3 мыши, имеющая код доступа в Genbank NP\_032505. Также, LAG-3 известен в данной области как, например, CD223. Последовательность LAG-3 человека может отличаться от LAG-3 человека в Genbank под номером доступа NP\_002277 содержанием, например, консервативных мутаций или мутаций в неконсервативных областях, и LAG-3 обладает по существу такой же биологической функцией, как LAG-3 человека в Genbank под номером доступа NP\_002277. Например, биологической функцией LAG-3 человека является наличие эпипота во внеклеточном домене LAG-3, который специфически связывается антителом согласно настоящему изобретению, или биологической функцией LAG-3 человека является связывание с молекулами МНС класса II.

Термин "лиофилизат", используемый в связи с лекарственной формой в соответствии с изобретением, обозначает лекарственную форму, которая изготовлена с помощью методов сушки вымораживанием, известных в данной области. Растворитель (например, вода) удаляют путем замораживания с последующей сублимацией под вакуумом и десорбцией остаточной воды при повышенной температуре. В фармацевтической области лиофилизат, как правило, обладает остаточной влажностью около 0,1-5% мас./мас. и представлен в виде порошка или физически стабильной пористой массы. Лиофилизат характеризуется быстрым растворением после добавления восстанавливающей среды.

Термин "Ig-подобный рецептор киллерных клеток", "рецептор подавления цитотоксичности" или "KIR" относится к белку или полипептиду, кодируемому геном, который является членом семейства генов KIR, или кДНК, полученной из такого гена. Подробное описание семейства генов KIR, включая номенклатуру KIR-генов и продукты KIR-генов, а также номера доступов в Genbank для образцовых KIR, содержится в работе M. Carrington and P. Norman "The KIR Gene Cluster", доступной на веб-сайте NCBI Bookshelf (доступна на ncbi.nlm.nih.gov/books). Используемый здесь термин "KIR" включает KIR человека (hKIR), варианты, изоформы и видовые гомологи hKIR, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий с hKIR эпипот. Последовательности KIR-генов человека и кДНК, а также их белковые продукты, доступны в публичных базах данных, включая GenBank. Неограничивающие образцовые записи KIR человека в GenBank имеют следующие номера доступа: KIR2DL1: номер доступа Genbank U24076, NM\_014218, AAR16197 или L41267; KIR2DL2: номер доступа Genbank U24075 или L76669; KIR2DL3: номер доступа Genbank U24074 или L41268; KIR2DL4: номер доступа Genbank X97229; KIR2DS1: номер доступа Genbank X89892; KIR2DS2: номер доступа Genbank L76667; KIR2DS3: номер доступа Genbank NM\_012312 или L76670 (сплайс вариант); KIR3DL1: номер доступа Genbank L41269; и KIR2DS4: номер доступа Genbank AAR26325. KIR может содержать от 1 до 3 внеклеточных доменов, и может иметь длинный (то есть более 40 аминокислот) или короткий (то есть менее 40 аминокислот) цитоплазматиче-

ский хвост. Как описано ранее, эти особенности определяют номенклатуру KIR. Кроме того, описание KIR содержится в международной публикации WO/2014/055648, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

"Белок программируемой гибели-1 (PD-1)" относится к иммуноингибирующему рецептору, принадлежащему семейству CD28. PD-1 экспрессируется преимущественно на ранее активированных Т-клетках *in vivo* и связывается с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. Используемый здесь термин "PD-1" включает PD-1 человека (hPD-1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-1, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-1. Полная последовательность hPD-1 можно найти под номером доступа GenBank U64863. "PD-1" и "рецептор PD-1" используются здесь взаимозаменяюще.

"Лиганд-1 белка программируемой гибели (PD-L1)" представляет собой один из двух гликопротеиновых лигандов клеточной поверхности для PD-1 (другим является PD-L2), который подавляет активацию Т-клеток и секрецию цитокинов при связывании с PD-1. Используемый здесь термин "PD-L1" включает PD-L1 человека (hPD-L1), варианты, изоформы и видовые гомологи hPD-L1, и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с hPD-L1. Полную последовательность hPD-L1 можно найти под номером доступа GenBank Q9NZQ7.

Используемый здесь термин "восстановленная лекарственная форма" означает лекарственную форму, которая лиофилизована и повторно растворена путем добавления разбавителя. Разбавитель может представлять собой, например, 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций, USP или 5% раствор декстрозы для инъекций, USP.

"Субъект" включает любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин "не относящееся к человеку животное" включает, но без ограничения, позвоночных, таких как не относящиеся к человеку приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. Термины "субъект" и "пациент" используются здесь взаимозаменяюще.

"Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает субъекта от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, что подтверждается ослаблением тяжести симптомов заболевания, увеличением частоты или длительности периодов отсутствия симптомов заболевания, или предотвращением ухудшения или нетрудоспособности вследствие поражения заболеванием. Способность терапевтического агента стимулировать регрессию заболевания может быть оценена с использованием различных способов, известных специалисту в данной области, например, у пациентов-людей во время клинических испытаний, в системах животных моделей, являющихся предикторами эффективности у человека, или путем анализа активности агента в анализах *in vitro*.

Используемая здесь "субтерапевтическая доза" означает дозу терапевтического соединения (например, антитела), которая ниже обычной или типичной дозы терапевтического соединения при введении отдельно для лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака).

"Лечение" или "терапия" субъекта относится к любому типу вмешательства или процессу, проводимому на субъекте, или введению активного агента субъекту с целью инвертирования течения, облегчения, уменьшения интенсивности, ингибирования, замедления или предотвращения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или повторного возникновения симптома, осложнения или состояния, или биохимического показателя, связанного с заболеванием.

Термины "приблизительно" или "состоящий по существу из" относятся к величине или композиции, которая находится в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретной величины или композиции, определенной специалистом в данной области, которая будет зависеть отчасти от того, как данная величина или композиция измерена или определена, то есть ограничений конкретной системы измерения. Например, "приблизительно" или "состоящий по существу из" может означать в пределах 1 стандартного отклонения или более чем 1 стандартного отклонения согласно практике в данной области. Альтернативно, "приблизительно" или "состоящий по существу из" может означать диапазон до 10% или 20% (то есть  $\pm 10\%$  или  $\pm 20\%$ ). Например, примерно 3 мг может включать любое число в диапазоне от 2,7 мг до 3,3 мг (для 10%) или от 2,4 мг до 3,6 мг (для 20%). Кроме того, в частности, в отношении биологических систем или процессов, термины могут означать вплоть до значения или до 5-кратного значения величины. При использовании конкретных величин или композиций в данном описании и формуле изобретения, если не указано иное, значение "приблизительно" или "состоящий по существу из", как предполагается, должны быть в пределах приемлемого диапазона ошибок для этой конкретной величины или композиции.

Используемые здесь термины "один раз приблизительно каждую неделю", "один раз приблизительно каждые две недели" или другие аналогичные интервалы дозирования означают приблизительные числа. "Один раз приблизительно каждую неделю" может включать каждые семь дней  $\pm$  один день, то есть от каждого шести дней до каждого семи дней. "Один раз каждые две недели" может включать каждые четырнадцать дней  $\pm$  три дня, то есть от каждого одиннадцати дней до каждого семнадцати дней. Анало-

гичные приближения применяют, например, к одному разу приблизительно каждые три недели, одному разу приблизительно каждые четыре недели, одному разу приблизительно каждые пять недель, одному разу приблизительно каждые шесть недель и одному разу приблизительно каждые двенадцать недель. В некоторых вариантах осуществления интервал дозирования, представляющий один раз приблизительно каждые шесть недель или один раз приблизительно каждые двенадцать недель, означает, что первую дозу можно вводить в любой день на первой неделе, а затем следующую дозу можно вводить в любой день на шестой или двенадцатой неделе, соответственно. В других вариантах осуществления интервал дозирования, представляющий один раз приблизительно каждые шесть недель или один раз приблизительно каждые двенадцать недель, означает, что первую дозу вводят в определенный день первой недели (например, в понедельник), а затем следующую дозу вводят в тот же день шестой или двенадцатой недели (то есть в понедельник), соответственно.

Как описано здесь, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий величину любого целого числа в пределах указанного диапазона и, по необходимости, его долей (например, одну десятую или одну сотую целого числа), если не указано иное.

Различные аспекты изобретения описаны более подробно в следующих подразделах.

#### Анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела.

Композиция согласно изобретению включает первое антитело и второе антитело в соотношении от 1:100 до 100:1. В одном аспекте первое антитело представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело. PD-1 является ключевым рецептором иммунных контрольных точек, экспрессируемым активированными Т- и В-клетками, и опосредует иммуносупрессию. PD-1 является членом семейства рецепторов CD28, которое включает CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 и BTLA. Было идентифицировано два гликопroteиновых лиганда на клеточной поверхности для PD-1, лиганд программируемой смерти 1 (Programmed Death Ligand-1, PD-L1) и лиганд программируемой смерти 2 (Programmed Death Ligand-2, PD-L2), которые экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках, а также при многих типах рака и, как было показано, подавляют Т-клеточную активацию и секрецию цитокина при связывании с PD-1. Ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 опосредует высокую противоопухолевую активность в преклинических моделях.

Человеческие моноклональные антитела (HuMAb), которые специфически связываются с PD-1 с высокой аффинностью, описаны в патентах США 8008449 и 8779105. Другие анти-PD-1 mAb описаны, например, в патентах США 6808710, 7488802, 8168757 и 8354509, и публикации PCT WO 2012/145493. Каждое из анти-PD-1 HuMAb, описанных в патенте США 8008449, проявляет одно или несколько из следующих свойств: (a) связывается с PD-1 человека с  $K_D$ , равной  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, определенной с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием биосенсорной системы Biacore; (b) по существу не связывается с CD28, CTLA-4 или ICOS человека; (c) увеличивает пролиферацию Т-клеток в анализе реакции лимфоцитов в смешанной культуре (MLR); (d) увеличивает продуцирование интерферона-гамма в анализе MLR; (e) увеличивает секрецию интерлейкина-2 (IL-2) в анализе MLR; (f) связывается с PD-1 человека и PD-1 собакоподобной обезьяны; (g) ингибирует связывание PD-L1 и/или PD-L2 с PD-1; (h) стимулирует антигенспецифические ответные реакции памяти; (i) стимулирует ответные реакции антител; и (j) ингибирует рост опухолевых клеток *in vivo*. Анти-PD-1 антитела, применяющиеся в настоящем изобретении, включают mAb, которые специфически связываются с PD-1 человека и проявляют по меньшей мере одно, предпочтительно по меньшей мере пять из указанных выше свойств.

В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб (также известный как "OPDIVO®"; ранее обозначенный как 5C4, BMS-936558, MDX-1106 или ONO-4538) представляет собой полностью человеческое антитело IgG4 (S228P), действующее против ингибитора иммунных контрольных точек PD-1, которое селективно предотвращает взаимодействие с лигандами PD-1 (PD-L1 и PD-L2), тем самым блокируя подавление противоопухолевых функций Т-клеток (патент США 8,008,449; Wang et al., 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56). В другом варианте осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент перекрестно конкурирует с ниволумабом. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент связывается с тем же эпиптом, что и ниволумаб. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело имеет такие же CDR, что и ниволумаб.

В другом варианте осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент перекрестно конкурирует с пембролизумабом. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент связывается с тем же эпиптом, что и пембролизумаб. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело имеет такие же CDR, что и пембролизумаб. В другом варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб (также известный как "KEYTRUDA®", ламбролизумаб и MK-3475) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG4, направленное против человеческого рецептора PD-1 клеточной поверхности (программируемой смерти-1 или программируемой клеточной смерти-1). Пембролизумаб описан, например, в патентах США 8354509 и 8900587; см. также <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789> (последний доступ: 14 декабря 2014 г.). FDA одобрило применение пембролизумаба для лечения рецидивирующей или рефрактерной меланомы.

В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент перекрестно конкурирует с MEDI0608. В еще других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и MEDI0608. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело имеет такие же CDR, что и MEDI0608. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой MEDI0608 (ранее AMP-514), которое представляет собой моноклональное антитело. Описание MEDI0608 содержится, например, в патентах США 8609089B2 или на <http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=756047> (последний доступ 14 декабря 2014 г.).

В определенных вариантах осуществления первого антитело представляет собой анти-PD-1 антагонист. Одним из примеров анти-PD-1 антагониста является AMP-224, который представляет собой белок слияния Fc с B7-DC. AMP-224 описан в публикации 2013/0017199 или на веб-сайте <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=700595> (последний доступ 9 июля 2015 г.).

В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент перекрестно конкурирует с BGB-A317. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его фрагмент связывается с тем же эпитопом, что и BGB-A317. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело содержит такие же CDR, что и BGB-A317. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой BGB-A317, которое представляет собой гуманизированное моноклональное антитело. Описание BGB-A317 содержится в публикации 2015/0079109.

Анти-PD-1 антитела, полезные для раскрытых композиций, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с PD-1 человека и перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека с ниволумабом (см., например, патенты США 8008449 и 8779105; WO 2013/173223). Способность антител перекрестно конкурировать за связывание с антигеном указывает на то, что эти антитела связываются с одной и той же областью эпитопа антигена и стерически затрудняют связывание других перекрестно конкурирующих антител с этой конкретной областью эпитопа. Предполагается, что эти перекрестно конкурирующие антитела обладают функциональными свойствами, высоко схожими со свойствами ниволумаба благодаря их связыванию с той же самой областью эпитопа PD-1. Перекрестно-конкурирующие антитела могут быть легко идентифицированы, исходя из их способности перекрестно-конкурировать с ниволумабом в стандартных анализах связывания с PD-1, таких как анализ Biacore, анализы ELISA или проточная цитометрия (см., например, WO 2013/173223).

В определенных вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-1 человека, или связываются с той же самой областью эпитопа PD-1 человека, что и ниволумаб, представляют собой моноклональные антитела (mAb). Для введения субъектам-людям эти перекрестно-конкурирующие антитела могут представлять собой химерные антитела или гуманизированные, или человеческие антитела. Такие химерные, гуманизированные или человеческие антитела могут быть получены и выделены с помощью способов, хорошо известных в данной области.

Анти-PD-1 антитела, полезные для композиций раскрытоого изобретения, также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают: (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V<sub>L</sub>, V<sub>H</sub>, C<sub>L</sub> и C<sub>H1</sub>; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком при шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V<sub>H</sub>- и C<sub>H1</sub>-доменов; и (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V<sub>L</sub>- и V<sub>H</sub>-доменов единственного плеча антитела.

Анти-PD-1 антитела, подходящие для применения в раскрытых композициях, представляют собой антитела, которые связываются с PD-1 с высокой специфичностью и аффинностью, блокируют связывание PD-L1 и/или PD-L2, и ингибируют иммуносупрессивный эффект сингапального пути PD-1. В любой из композиций или в любом из способов, раскрытых здесь, анти-PD-1 "антитело" включает антигенсвязывающую часть или фрагмент, который связывается с рецептором PD-1 и проявляет функциональные свойства, сходные со свойствами полных антител в отношении ингибирования связывания с лигандом и активации иммунной системы. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть перекрестно конкурирует с ниволумабом за связывание с PD-1 человека. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое моноклональное антитело или его часть. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В других вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. Могут быть использованы антитела изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть содержит константную область тяжелой цепи, которая относится к изотипу IgG1 или IgG4 человека. В других определенных вариантах осуществления последовательность константной области тяжелой цепи IgG4 анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающей части содержит мутацию S228P, которая заменяет остаток серина в шарнирной области на остаток пролина, обычно обнаруживаемого в соответствующем положении в антителах изотипа IgG1. Эта мутация, которая присутствует в ниволумабе, предотвращает

замену Fab-плеча на эндогенные антитела IgG4, при этом сохраняя низкую аффинность в отношении активации Fc-рецепторов, связанных с антителами IgG4 дикого типа (Wang et al., 2014). В еще других вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, которая представляет собой константную область каппа или лямбда человека. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающая часть представляет собой mAb или его антигенсвязывающую часть. В определенных вариантах осуществления любого из терапевтических способов, описанных в настоящем документе, включающих введение анти-PD-1 антитела, указанное анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. В других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело выбрано из человеческих антител 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, описанных в патенте США 8008449. В еще других вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой MEDI0608 (ранее под названием AMP-514), AMP-224 или пидилизумаб (CT-011).

В определенных вариантах осуществления первое антитело для раскрытой композиции представляет собой анти-PD-L1 антитело. Так как анти-PD-1 и анти-PD-L1 антитела нацелены на один и тот же сигнальный путь и, как было показано в клинических исследованиях, проявляют сходные уровни эффективности в различных типах рака, анти-PD-L1 антитело может быть заменено анти-PD-1 антителом в любом из терапевтических способов или в любой из композиций, раскрытых здесь. В определенных вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой BMS-936559 (ранее называемое 12A4 или MDX-1105) (см., например, патент США 7943743; WO 2013/173223). В других вариантах осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой MPDL3280A (также известное как RG7446 и атезолизумаб) (см., например, Herbst et al., 2013 J Clin Oncol 31(suppl): 3000; патент США 8217149), MEDI4736 (Khleif, 2013, In: Proceedings from the European Cancer Congress 2013; September 27-October 1, 2013; Amsterdam, The Netherlands. Abstract 802) или MSB0010718C (также называемое как авелумаб; см. US 2014/0341917). В определенных вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 человека или связываются с той же самой областью эпитопа PD-L1 человека, что и вышеуказанные анти-PD-L1 антитела, представляют собой моноклональные антитела (mAb). Для введения субъектам-людям эти перекрестно конкурирующие антитела могут представлять собой химерные антитела, или могут представлять собой гуманизированные или человеческие антитела. Такие химерные, гуманизированные или человеческие моноклональные антитела (mAb) могут быть получены и выделены с помощью способов, хорошо известных в данной области.

#### Анти-CTLA-4 антитела.

Анти-CTLA-4 антитела, используемые для настоящего изобретения, связываются с CTLA-4 человека таким образом, чтобы нарушить взаимодействие CTLA-4 с человеческим рецептором B7. Так как взаимодействие CTLA-4 с B7 трансдуцирует сигнал, приводя к инактивации Т-клеток, несущих рецептор CTLA-4, нарушение взаимодействия эффективно индуцирует, усиливает или продлевает активацию таких Т-клеток, тем самым индуцируя, усиливая или продлевая иммунный ответ.

Человеческие моноклональные антитела (HuMAb), которые специфически связываются с CTLA-4 с высокой аффинностью, описаны в патентах США 6984720 и 7605238. Другие анти-CTLA-4 моноклональные антитела (mAb) описаны, например, в патентах США 5977318, 6051227, 6682736 и 7034121. Анти-CTLA-4 человеческие моноклональные антитела (HuMAb), описанные в патентах США 6984720 и 7605238, как было показано, обладают одним или несколькими из следующих свойств: (a) специфически связываются с CTLA-4 человека с аффинностью связывания, выраженной равновесной константой ассоциации ( $K_a$ ), составляющей по меньшей мере примерно  $10^7 \text{ M}^{-1}$  или примерно  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , или примерно от  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  до  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  или выше, определенную с помощью анализа Biacore; (b) кинетической константой ассоциации ( $k_a$ ), составляющей по меньшей мере примерно  $10^3$ , примерно  $10^4$  или примерно  $10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; (c) кинетической константой диссоциации ( $k_d$ ), составляющей по меньшей мере примерно  $10^3$ , примерно  $10^4$  или примерно  $10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; и (d) ингибитирует связывание CTLA-4 с B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86). Анти-CTLA-4 антитела, полезные для настоящего изобретения, включают моноклональные антитела (mAb), которые специфически связываются с CTLA-4 человека и обладает по меньшей мере одним, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя из вышеуказанных свойств. Иллюстративное клиническое анти-CTLA-4 антитело представляет собой человеческое mAb 10D1 (в настоящее время известное как ипилимумаб и доступное на рынке под торговым названием YERVOY®), как описано в патенте США 6984720.

Иллюстративное клиническое анти-CTLA-4 антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело (mAb) 10D1 (в настоящее время известное как ипилимумаб и доступное на рынке под торговым названием YERVOY®), как описано в патенте США 6984720. Ипилимумаб представляет собой анти-CTLA-4 антитело, предназначенное для применения в раскрытых здесь способах. Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG1, которое блокирует связывание CTLA-4 с его лигандами B7, тем самым стимулируя активацию Т-клеток и улучшая общую выживаемость (OS) пациентов с распространенной меланомой.

Еще одним анти-CTLA-4 антителом, полезным для способов согласно настоящему изобретению, является тремелимумаб (также известный как CR-675,206). Тремелимумаб является человеческим моно-

клональным анти-CTLA-4 антителом IgG2.

Тремелимумаб описан в WO/2012/122444, публикации заявки на патент США 2012/263677 или публикации WO 2007/113648 A2.

Анти-CTLA-4 антитела, полезные для раскрытой композиции, также включают выделенные антитела, которые специфически связываются с человеческим CTLA-4 и перекрестно конкурируют с ипилимумабом или тремелимумабом за связывание с CTLA-4 человека, или связываются с той же самой областью эпитопа CTLA-4 человека, что и ипилимумаб или тремелимумаб. В определенных вариантах осуществления антитела, которые перекрестно конкурируют за связывание с CTLA-4 человека, или связываются с той же самой областью эпитопа CTLA-4 человека, что и ипилимумаб или тремелимумаб, представляют собой антитела, содержащие тяжелую цепь изотипа IgG1 человека. Для введения субъектам людям эти перекрестно конкурирующие антитела представляют собой химерные антитела или гуманизированные, или человеческие антитела. Полезные анти-CTLA-4 антитела также включают антигенсвязывающие части вышеуказанных антител, такие как фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd или Fv.

#### Anmu-LAG-3 антитела.

Анти-LAG-3 антитела согласно настоящему изобретению связываются с LAG-3 человека. Антитела, которые связываются с LAG-3, описаны в международной публикации WO/2015/042246 и публикациях США 2014/0093511 и 2011/0150892.

Иллюстративные анти-LAG-3 антитела, полезные для настоящего изобретения, представляют собой 25F7 (описано в публикации США 2011/0150892). Дополнительное иллюстративное анти-LAG-3 антитело, полезное для настоящего изобретения, представляет собой BMS-986016. В одном варианте осуществления анти-LAG-3 антитело, полезное для композиции, перекрестно конкурирует с 25F7 или BMS-986016. В другом варианте осуществления анти-LAG-3 антитело, полезное для композиции, связывается с тем же самым эпитопом, что и 25F7 или BMS-986016. В других вариантах осуществления анти-LAG-3 антитело содержит шесть CDR 25F7 или BMS-986016.

#### Анти-CD137 антитела.

Анти-CD137 антитела специфически связываются и активируют CD137-экспрессирующие иммунные клетки, стимулируя иммунный ответ, в частности, цитотоксический Т-клеточный ответ против опухолевых клеток. Антитела, которые связываются с CD137, описаны в публикации США № 2005/0095244 и патентах США 7288638, 6887673, 7214493, 6303121, 6569997, 6905685, 6355476, 6362325, 6974863 и 6210669.

В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб (BMS-663513), описанный в патente США 7288638 (20H4.9-IgG4 [10C7 или BMS-663513]). В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой BMS-663031 (20H4.9-IgG1), описанное в патенте США 7288638. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой 4E9 или BMS-554271, описанное в патенте США 6887673. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой антитело, описанное в патентах США 7214493; 6303121; 6569997; 6905685 или 6355476. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой 1D8 или BMS-469492; 3N3 или BMS-469497; или 3E1, описанное в патенте США 6362325. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой антитело, описанное в опубликованном патенте США 6974863 (такое как 53A2). В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой антитело, раскрытое в опубликованном патенте США 6210669 (такое как 1D8, 3B8 или 3E1). В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой PF-05082566 (PF-2566), разработанный компанией Pfizer. В других вариантах осуществления анти-CD137 антитело, полезное для изобретения, перекрестно конкурирует с анти-CD137 антителами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело связывается с тем же самым эпиптомом, что и анти-CD137 антитело, раскрытое в настоящем документе. В других вариантах осуществления анти-CD137 антитело, полезное для изобретения, содержит шесть CDR анти-CD137 антител, раскрытых в настоящем документе.

#### Анти-KIR антитела.

Антитела, которые специфически связываются с KIR, блокируют взаимодействие между иммуноглобулиноподобными рецепторами киллерных клеток (Killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR) на NK-клетках с их лигандами. Блокирование этих рецепторов способствует активации NK-клеток и, потенциально, разрушению опухолевых клеток в дальнейшем. Примеры анти-KIR антител содержатся в международных публикациях WO/2014/055648, WO 2005/003168, WO 2005/009465, WO 2006/072625, WO 2006/072626, WO 2007/042573, WO 2008/084106, WO 2010/065939, WO 2012/071411 и WO/2012/160448.

Одним анти-KIR антителом, полезным для настоящего изобретения, является лирилумаб (также называемый как BMS-986015, IPH2102 или S241P вариант 1-7F9), впервые описанный в международной публикации WO 2008/084106. Еще одним анти-KIR антителом, полезным для настоящего изобретения, является 1-7F9 (также называемый как IPH2101), описанный в международной публикации WO 2006/003179. В одном варианте осуществления анти-KIR антитело, полезное для композиции согласно настоящему изобретению, перекрестно конкурирует за связывание с лиримумабом или I-7F9 с KIR. В

другом варианте осуществления анти-KIR антитело связывается с тем же самым эпитопом, что и лирилумаб или I-7F9. В других вариантах осуществления анти-KIR антитело содержит шесть CDR лирилумаба или I-7F9.

#### Анти-GITR антитела.

Анти-GITR антитела, предназначенные для комбинирования с анти-PD-1 антителом в фиксированной дозе, могут представлять собой любое анти-GITR антитело, которое специфически связывается с мишенью, GITR человека, и активирует индуцированный глюкокортикоидами рецептор фактора некроза опухоли (GITR). GITR является членом суперсемейства TNF-рецепторов, который экспрессируется на поверхности множества типов иммунных клеток, включая регуляторные Т-клетки, эффекторные Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (NK) клетки и активированные дендритные клетки ("анти-GITR антитела-агонисты"). В частности, активация GITR увеличивает пролиферацию и функционирование эффекторных Т-клеток, а также подавляет супрессию, индуцированную активированными Т-регуляторными клетками. Кроме того, стимуляция GITR содействует противоопухолевому иммунитету путем повышения активности других иммунных клеток, таких как NK-клетки, антигенпрезентирующие клетки и В-клетки. Примеры анти-GITR антител описаны в международных публикациях WO/2015/031667, WO2015/184099, WO2015/026684, WO 11/028683 и WO/2006/105021, патентах США 7812135 и 8388967, и публикациях США 2009/0136494, 2014/0220002, 2013/0183321 и 2014/0348841.

В одном варианте осуществления анти-GITR антитело, полезное для настоящего изобретения, представляет собой TRX518 (описано, например, в Schaer et al., Curr Opin Immunol. (2012) Apr; 24(2): 217-224 и WO/2006/105021). В другом варианте осуществления анти-GITR антитело, полезное для настоящего изобретения, представляет собой MK4166 или MK1248 и антитела, описанные в WO11/028683 и патенте США 8709424, и содержащие, например, цепь VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 104, и цепь VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 105, при этом последовательности SEQ ID NO взяты из WO11/028683 или патента США 8709424). В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой анти-GITR антитело, описанное в WO2015/031667, например, антитело, содержащее VH CDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 31, 71 и 63 по WO2015/031667, соответственно, и VL CDR 1-3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 5, 14 и 30 по WO2015/031667. В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой анти-GITR антитело, которое описано в WO2015/184099, например, антитело Hum231#1 или Hum231#2, или их CDR, или их производные (например, pab1967, pab1975 или pab1979). В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой анти-GITR антитело, которое раскрыто в JP2008278814, WO09/009116, WO2013/039954, US20140072566, US20140072565, US20140065152 или WO2015/026684, или представляет собой INBRX-110 (INHIBRx), LKZ-145 (Novartis) или MEDI-1873 (MedImmune). В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой анти-GITR антитело, которое описано в PCT/US2015/033991 (например, антитело, содержащее вариабельные области 28F3, 18E10 или 19D3). Например, анти-GITR антитело может представлять собой антитело, содержащее следующие цепи VH и VL или их CDR:

VH:

QVQLVESGGVVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVYEG  
SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYYG  
MDVVGQGTTVTVS (SEQ ID NO: 1), и

VL:

AIQLTQSPSSLASAVGDRVITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2);

или

VH:

QVQLVESGGVVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYGFHWVRQAPGKGLEWVAIVYAG  
SNKFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGQLDYYYYYVM  
DVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 3), и

VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEAKSLIYAASSLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYNSPYTFQGQGTKLEIK (SEQ ID NO:  
 4); или

VH:

VQLVESGGVVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVYAGS  
 NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGRIAVAFYYSM  
 VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5), и

VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEAKSLIYAASSLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYNSPYTFQGQGTKLEIK (SEQ ID NO:  
 6).

В определенных вариантах осуществления антитело, содержащее пару вышеуказанных легких цепей VH и VL или их CDR, содержит константную область тяжело цепи IgG1 изотипа, дикого типа или мутированного, например, чтобы отсутствовали эффекторные функции. В одном варианте осуществления анти-GITR антитело содержит следующие аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей: тяжелая цепь:

QVQLVESGGVVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVYEG  
 SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYG  
 MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
 GALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVER  
 KCCVECPGPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY  
 VDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTvvHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK  
 TISKTKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
 (SEQ ID NO: 7), и

легкая цепь:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP  
 SRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQFNSPYTFQGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL  
 SSTLTL SKADYEKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8), или

тяжелая цепь:

QVQLVESGGVVQPGRLSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIVYEG  
 SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSMVRGDYYG  
 MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
 GALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK  
 SCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
 WYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSS  
 IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN  
 NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
 G (SEQ ID NO: 9), и

легкая цепь:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP  
 SRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQFNSPYTFQGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL  
 SSTLTL SKADYEKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 8).

В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело для композиции согласно настоящему изобретению перекрестно конкурирует с анти-GITR антителом, описанным в настоящем документе, например, TRX518, MK4166 или антителом, содержащим аминокислотную последовательность до-

мена VH и домена VL, описанную здесь. В некоторых вариантах осуществления анти-GITR антитело для композиции согласно настоящему изобретению связывается с тем же самым эпипотом, что и анти-GITR антитело, описанное здесь, например, TRX518, MK4166 или антитело, содержащее аминокислотную последовательность домена VH и домена VL, описанную здесь. В определенных вариантах осуществления анти-GITR антитело содержит шесть CDR TRX518, MK4166 или антител, содержащих аминокислотную последовательность домена VH и домена VL, описанную здесь. Иллюстративная фармацевтическая композиция содержит анти-PD-1 антитело, например, ниволумаб, МК-3475 (пембролизумаб) или атезолизумаб и анти-GITR антитело-агонист, например, TRX518, MK4166 или антитело, содержащее аминокислотную последовательность домена VH и домена VL, описанную здесь, при этом соотношение количества (например, концентрации (например, мг/мл) или массы (например, мг)) анти-PD-1 антитела к количеству анти-GITR антитела (например, концентрации (например, мг/мл) или массы (например, мг), соответственно) составляет около 1:1-20; около 1:1-10; около 1:1-5; около 1:2-5; около 1:2-3; около 1:3-5; около 1-20:1; около 1-10:1; около 1-5:1; около 2-5:1; около 2-3:1; или около 3-5:1. Например, соотношение (i) анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитела к (2) анти-GITR антителу может составлять 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 или 10:1. ":" относится к "к", например, "1:1-20" относится к соотношению 1 к числу, выбранному из 1-20. Комбинацию можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые три недели или один раз в месяц.

В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело, например, ниволумаб, пембролизумаб или атезолизумаб, составляют вместе с анти-GITR антителом, при этом анти-GITR антитело присутствует в дозе, например, постоянной дозе от 0,1 мг до 1000 мг, такой как 0,1-100 мг, 0,5-100 мг, 1-100 мг, 5-100 мг, 10-100 мг, 50-100 мг, 0,1-300 мг, 0,5-300 мг, 1-300 мг, 5-300 мг, 10-300 мг, 50-300 мг, 100-300 мг или 200-300 мг. Иллюстративные количества анти-GITR антитела, которые могут быть составлены вместе с анти-PD-1 антителом или анти-PD-L1 антителом, включают около 0,1 мг, около 0,3 мг, около 0,5 мг, около 1 мг, около 3 мг, около 10 мг, около 30 мг, около 100 мг, около 200 мг, около 240 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 400 мг, около 500 мг, около 600 мг, около 700 мг, около 800 мг, около 900 или около 1000 мг. В определенных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело составлено вместе с анти-GITR антителом, при этом доза анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела представляет собой дозу (например, постоянную дозу), равную 100-300 мг, такую как 200-300 мг, 220-260 мг, 230-250 мг или 240 мг, такую как около 60 мг, около 80 мг, около 100 мг, около 120 мг, около 140 мг, около 160 мг, около 180 мг, около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг или около 300 мг.

В иллюстративных вариантах осуществления анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело, например, ниволумаб, пембролизумаб или атезолизумаб, составляют вместе с анти-GITR антителом, например, антителом, содержащим: (i) домены VH и VL, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно, или SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно; или CDR1, CDR2, CDR3 домена VH, и CDR1, CDR2 и CDR3 домена VL любой из этих пар вариабельных областей; или (ii) тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 и 8, соответственно, или SEQ ID NO: 7 и 9, соответственно, при следующих фиксированных соотношениях доз: 80-300 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела к 1-1000 мг анти-GITR антитела; 80-300 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела к 1-100 мг анти-GITR антитела; 80-300 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела к 10-100 мг анти-GITR антитела; 80-300 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела к 10-300 мг анти-GITR антитела, или 80-300 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела к 100-300 мг анти-GITR антитела. В иллюстративных вариантах осуществления ниволумаб составляют вместе с анти-GITR антителом, при этом доза ниволумаба составляет около 80 мг или около 240 мг. Комбинацию с фиксированным соотношением доз можно вводить путем внутривенной инфузии в течение, например, около 30 мин, около 30-60 мин, около 60 мин или около 60-90 мин примерно каждую 1, 2, 3 или примерно каждые 4 недели.

В определенных вариантах осуществления около 3 мг/кг анти-PD-1 антитела, например, ниволумаба, можно вводить вместе, например, в виде комбинации с фиксированным соотношением доз, с около 0,1-10 мг/кг, около 0,1-5 мг/кг, около 0,5-10 мг/кг, около 0,5-5 мг/кг, около 0,5-2 мг/кг, около 1-2 мг/кг или около 2-5 мг/кг анти-GITR антитела, например, TRX518, MK4166, или антитела, содержащего тяжелые и легкие цепи или вариабельные области, или CDR, описанные здесь, например, в виде внутривенной инфузии в течение, например, около 30 мин, около 30-60 мин, около 60 мин или около 60-90 мин примерно каждые 1, 2, 3 или 4 недели. В определенных вариантах осуществления около 2 мг/кг анти-PD-1 антитела, например, ниволумаба или МК-3475, вводят вместе, например, в виде комбинации с фиксированным соотношением доз, с около 0,1-10 мг/кг, около 0,1-5 мг/кг, около 0,5-10 мг/кг, около 0,5-5 мг/кг, около 0,5-2 мг/кг, около 1-2 мг/кг или около 2-5 мг/кг анти-GITR антитела, например, MK4166, или антитела, содержащего тяжелые и легкие цепи или вариабельные области, или CDR, описанные здесь, например, в виде внутривенной инфузии в течение, например, около 30 мин, около 30-60 мин или около 60 мин примерно каждые 1, 2, 3 или 4 недели. Количество антител в мг/кг может быть рассчитано для определения массы (мг) или концентрации (мг/мл) антител, требуемых для лекарственной формы с фиксированным соотношением доз. В определенных вариантах осуществления анти-PD-

1 антитело и анти-GITR антитело могут быть представлены в виде лиофилизированной композиции, например, во флаконе или шприце с двойной камерой. Лиофилизированная композиция может содержать, например, около 50 мг анти-PD-1 антитела или анти-PD-L1 антитела, например, ниволумаба, MK3475 или атезолизумаба, и около 5-250 мг, около 10-250 мг, около 30-100 мг, около 30-70 мг или около 50 мг анти-GITR антитела, например, TRX-518, MK4166, или антитела, содержащего тяжелые и легкие цепи или вариабельные области, или CDR, описанные здесь.

#### Дополнительные антитела.

В некоторых вариантах осуществления второе антитело, подлежащее комбинированию с первым антителом, представляет собой анти-TGF $\beta$  антитело, описанное в международной публикации WO/2009/073533. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-IL-10 антитело, описанное в международной публикации WO/2009/073533. В некоторых других вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-B7-H4 антитело, описанное в международной публикации WO/2009/073533. В определенных вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-Fas-лиганд антитело, описанное в международной публикации WO/2009/073533. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-CXCR4 антитело, описанное в публикации США 2014/0322208 (например, улокуплумаб (BMS-936564)). В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-мезотелин антитело, описанное в патенте США 8399623. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-HER2 антитело, например, герцептин (патент США 5821337), трастузумаб или адо-трастузумаб эмтанзин (Kadcyla, например, WO/2001/000244). В некоторых вариантах осуществления второе антитело, подлежащее комбинированию с первым антителом, представляет собой анти-CD27 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-CD-27 антитело представляет собой варлидумаб (также известный как "CDX-1127" и "1F5"), представляющий собой антитело человека класса IgG1, которое является агонистом к человеческому CD27, как описано, например, в патенте США 9169325. В некоторых вариантах осуществления второе антитело, подлежащее комбинированию с первым антителом, представляет собой анти-CD73 антитело. В определенных вариантах осуществления анти-CD73 антитело представляет собой CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f.

#### Лекарственные формы, фармацевтические композиции и дозы.

В лекарственной форме согласно настоящему изобретению первое антитело и второе антитело составлены в единую композицию согласно настоящему изобретению, например, фармацевтическую композицию, содержащую первое антитело и второе антитело, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления первое антитело представляет собой анти-PD-1 антитело. В другом варианте осуществления первое антитело представляет собой анти-PD-L1 антитело. Анти-PD-L1 антитело может быть использовано вместо анти-PD-1 антитела в любой композиции или способе, описанном в настоящем документе.

Используемый здесь "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой или все растворители, дисперсионные среды, материалы для покрытий, антибактериальные и противогрибковые средства, агенты, придающие изотоничность, и агенты, замедляющие абсорцию, и им подобные, которые являются физиологически совместимыми. В определенных вариантах осуществления носитель для композиции, содержащей антитело, является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). Фармацевтическая композиция согласно изобретению может включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей, антиоксидантов, водные и неводные носители, и/или адьюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты.

В одном варианте осуществления композиция, содержащая первое антитело и второе антитело, представлена в виде флакона для однократного применения. В другом варианте осуществления композиция, содержащая первое антитело и второе антитело, представлена в виде флакона для многократного применения.

В других вариантах осуществления первое антитело (например, анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело) составлено с любым известным вторым антителом. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-CTLA4 антитело. В определенных вариантах осуществления анти-CTLA4 антитело представляет собой тремелимумаб или ипилимумаб. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-CD137 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-LAG3 антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG3 антитело представляет собой 25F7. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-GITR антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-GITR антитело представляет собой MK4166, TRX518, антитело, содержащее CDR, вариабельные цепи или тяжелые и легкие цепи анти-GITR антител, которые описаны в PCT/US2015/033991 (например, антител 28F3, 18E10 или 19D3), или любое другое анти-GITR антитело, описанное здесь. В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-KIR антитело. В некоторых вариантах осуществления анти-KIR антитело представляет собой 1-7F9 или лирилумаб. В некоторых вариантах осуществления второе

антитело представляет собой анти-TGF $\beta$  антитело, анти-IL-10 антитело, анти-B7-H4 антитело, анти-Fas-лиганд антитело, анти-CXCR4 антитело, анти-мезотелин антитело, анти-CD27 антитело, анти-CD73 антитело или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления первое антитело и второе антитело содержатся в композиции в фиксированной дозе (то есть фиксированном соотношении). В других вариантах осуществления эта фиксированная доза составляет по меньшей мере от около 1:200 до около 200:1, по меньшей мере от около 1:150 до около 150:1, по меньшей мере от около 1:100 до около 100:1, по меньшей мере от около 1:75 до около 75:1, по меньшей мере от около 1:50 до около 50:1, по меньшей мере от около 1:25 до около 25:1, по меньшей мере от около 1:10 до около 10:1, по меньшей мере от около 1:5 до около 5:1, по меньшей мере от около 1:4 до около 4:1, по меньшей мере от около 1:3 до около 3:1, по меньшей мере от около 1:2 до около 2:1 мг анти-PD-1 антитела (или анти-PD-L1 антитела) к мг второго антитела. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза составляет по меньшей мере около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:6, около 1:7, около 1:8, около 1:9, около 1:10, около 1:15, около 1:20, около 1:30, около 1:40, около 1:50, около 1:60, около 1:70, около 1:80, около 1:90, около 1:100, около 1:120, около 1:140, около 1:160, около 1:180 или около 1:200 анти-PD-1 антитела (или анти-PD-L1 антитела) ко второму антителу. В некоторых вариантах осуществления фиксированная доза составляет по меньшей мере около 2:1, около 3:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1, около 10:1, около 15:1, около 20:1, около 30:1, около 40:1, около 50:1, около 60:1, около 70:1, около 80:1, около 90:1, около 100:1, около 120:1, около 140:1, около 160:1, около 180:1 или около 200:1 мг первого антитела к мг второго антитела.

В других вариантах осуществления композиция содержит первое антитело и второе антитело в определенном соотношении (например, от 200:1 до 1:200, от 100:1 до 1:100, от 20-1:1 до 1:1-20, или любом соотношении, описанном в настоящем документе), при этом композиция обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующих свойств: (i) агрегация в композиции сопоставима с агрегацией в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре от 2°C до 8°C; (ii) фрагментация в композиции сопоставима с агрегацией в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре от 2°C до 8°C; (iii) дезамидирование первого антитела или второго антитела в композиции сопоставимо с дезамидированием антитела в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре от 2°C до 8°C; (iv) уровень содержания механических включений в композиции сопоставим с уровнем содержания механических включений в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре от 2°C до 8°C; и (v) любую их комбинацию.

В еще других вариантах осуществления композиция содержит первое антитело и второе антитело в определенном соотношении (например, от 200:1 до 1:200, от 100:1 до 1:100, от 20-1:1 до 1:1-20 или любом соотношении, описанном здесь), при этом композиция обладает одним или несколькими свойствами, выбранными из группы, состоящей из следующих свойств: (i) агрегация в композиции сопоставима с агрегацией в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре 25°C; (ii) фрагментация в композиции сопоставима с фрагментацией в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре 25°C; (iii) дезамидирование первого антитела или второго антитела в композиции сопоставимо с дезамидированием антитела в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре 25°C; (iv) уровень содержания механических включений в композиции сопоставим с уровнем содержания механических включений в референсной композиции (то есть композиции, содержащей первое антитело или второе антитело) через 6 месяцев хранения при температуре 25°C; и (v) любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления агрегацию композиции оценивают по уровню содержания высокомолекулярных (HMW) фракций в композиции, измеренному методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC). В некоторых вариантах осуществления фрагментацию композиции оценивают по уровню содержания низкомолекулярных (LMW) фракций в композиции, измеренному методом SE-HPLC. В некоторых вариантах осуществления дезамидирование композиции оценивают по уровню содержания в композиции вариантов с кислотными зарядами, измеренному методом катионообменной хроматографии (CEX) или капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуальным детектированием по всей длине капилляра (iCIEF).

В некоторых вариантах осуществления количество анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 60 мг, около 80 мг, около 100 мг, около 120 мг, около 140 мг, около 160 мг, около 180 мг, около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг или около 300 мг. В некоторых вариантах осуществления количество анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг,



около 120 мг, около 140 мг, около 160 мг, около 180 мг, около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг, около 300 мг или около 350 мг. В некоторых вариантах осуществления количество анти-LAG3 антитела в композиции составляет примерно от 60 мг до 350 мг, примерно от 60 мг до 300 мг, примерно от 100 мг до 300 мг или примерно от 150 мг до 250 мг. В некоторых вариантах осуществления количество анти-LAG3 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 240 мг.

В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-CD137 антитело, и фиксированное соотношение доз составляет около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:10, около 10:1, около 5:1, около 4:1 или около 2:1 мг анти-PD-1 антитела к мг анти-CD137 антитела. В некоторых вариантах осуществления количество анти-CD137 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 1 мг, по меньшей мере около 2 мг, по меньшей мере около 3 мг, по меньшей мере около 4 мг, по меньшей мере около 5 мг, по меньшей мере около 6 мг, по меньшей мере около 7 мг, по меньшей мере около 8 мг, по меньшей мере около 9 мг, по меньшей мере около 10 мг, по меньшей мере около 12 мг, по меньшей мере около 15 мг или по меньшей мере около 20 мг. В некоторых вариантах осуществления количество анти-CD137 антитела в композиции составляет примерно от 1 мг до 20 мг, примерно от 1 мг до 15 мг, примерно от 5 мг до 12 мг или примерно от 5 мг до 10 мг. В некоторых вариантах осуществления количество анти-CD137 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 8 мг.

В некоторых вариантах осуществления второе антитело представляет собой анти-CD73 антитело, и фиксированное соотношение доз составляет около 1:1, около 1:2, около 1:3, около 1:4, около 1:5, около 1:10, около 10:1, около 5:1, около 4:1 или около 2:1 мг анти-PD-1 антитела к мг анти-CD73 антитела. В некоторых вариантах осуществления количество анти-CD73 антитела в композиции составляет примерно от 100 мг до 200 мг или примерно от 150 мг до 1600 мг. В некоторых вариантах осуществления количества анти-CD73 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 100 мг, 150 мг, 200 мг, 300 мг, 500 мг, 600 мг, 800 мг, 1000 мг, 1200 мг или 1600 мг.

В определенных вариантах осуществления анти-CD73 антитело CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f и ниволумаб вводят в виде с фиксированных доз в одной из следующих комбинаций доз: 50 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 50 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 150 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 150 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 300 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 300 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 600 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 600 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 1200 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 1200 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 1600 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 1600 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели; 2000 мг анти-CD73 антитела и 240 мг ниволумаба каждые две недели; 2000 мг анти-CD73 антитела и 360 мг ниволумаба каждые три недели.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело и второе антитело объединяют, используя существующие лекарственные формы двух антител (например, 2 мл анти-PD-1 антитела в цитратном буфере объединяют с 2 мл анти-CTLA4 антитела в Трис-буфере без замены буферов).

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит один или несколько дополнительных компонентов, выбранных из группы, состоящей из: объемообразующего агента, стабилизирующего агента, хелатирующего агента, поверхностно-активного вещества, буферного агента и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления буферный агент содержит цитратный буфер, Трис-буфер, Трис-Cl буфер, гистидиновый буфер, Трис-ацетатный буфер (ТАЕ), буфер НЕПЕС, Трис-боратный буфер (ТВЕ), натрий-fosфатный буфер, MES-буфер, буфер на основе сульфата аммония, буфер на основе фосфата калия, буфер на основе тиоцианата калия, сукцинатный буфер, тартратный буфер, буфер DIPSO, буфер НЕПPSO, буфер POPSO, буфер PIPES, буфер PBS, буфер MOPS, ацетатный буфер, фосфатный буфер, какодилатный буфер, глициновый буфер, сульфатный буфер, имидазольный буфер, буфер на основе гидрохлорида гуанидина, фосфат-цитратный буфер, боратный буфер, малонатный буфер, буфер на основе 3-пиколина, буфер на основе 2-пиколина, буфер на основе 4-пиколина, буфер на основе 3,5-лутидина, буфер на основе 3,4-лутидина, буфер на основе 2,4-лутидина, Aces-буфер, буфер на основе диэтилмалоната, буфер на основе N-метилимидазола, буфер на основе 1,2-диметилимидазола, TAPS-буфер, бис-Трис буфер, буфер на основе L-аргинина, лактатный буфер, гликолатный буфер.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело и второе антитело составляют в буфере, который основан на буферных условиях одной из двух индивидуальных лекарственных форм антител. В некоторых вариантах осуществления используемые буферные условия представляют собой буферные условия анти-PD-1 антитела. В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб, и два антитела составлены в буферной системе ниволумаба на основе цитрата. В некоторых вариантах осуществления буфером является цитратный буфер.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело и второе антитело составлены в буферных условиях, которые отличаются от буферных условий каждого из двух антител. В некоторых вариантах осуществления буфером является буфер на основе цитрата. В некоторых вариантах осуществления

концентрация цитрата в буфере составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата составляет примерно от 5 mM до 50 mM, в некоторых вариантах осуществления примерно от 5 mM до 40 mM, примерно от 5 mM до 30 mM, примерно от 5 mM до 20 mM, примерно от 5 mM до 15 mM, примерно от 10 mM до 30 mM или примерно от 15 mM до 25 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата составляет около 10 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата составляет около 20 mM.

В некоторых вариантах осуществления используемым буфером является буфер на основе Трис. В некоторых вариантах осуществления Трис-буфер представляет собой буфер Трис-Cl. В некоторых вариантах осуществления концентрация Трис-Cl в буфере составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация Трис-Cl составляет примерно от 5 mM до 50 mM, примерно от 10 mM до 50 mM, примерно от 10 mM до 40 mM, примерно от 10 mM до 30 mM или примерно от 15 mM до 25 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация Трис-Cl составляет около 20 mM.

В некоторых вариантах осуществления используемым буфером является буфер на основе гистидина. В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидина составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидина составляет примерно от 5 mM до 50 mM, примерно от 5 mM до 40 mM, примерно от 5 mM до 30 mM, примерно от 5 mM до 25 mM или примерно от 10 mM до 15 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация гистидина составляет около 20 mM.

В некоторых вариантах осуществления используемым буфером является собой Трис-цитратный буфер. В некоторых вариантах осуществления концентрация Трис-Cl составляет по меньшей мере около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM, и концентрация цитрата составляет по меньшей мере около 2 mM, около 5 mM, около 10 mM, около 15 mM, около 20 mM, около 25 mM, около 30 mM, около 35 mM, около 40 mM или около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация Tris-Cl составляет примерно от 5 mM до 20 mM, примерно от 5 mM до 15 mM или примерно от 10 mM до 15 mM, и концентрация цитрата составляет примерно от 1 mM до 15 mM, примерно от 1 mM до 10 mM или примерно от 5 mM до 10 mM. В некоторых вариантах осуществления концентрация Трис-Cl составляет около 13,3 mM и концентрация цитрата составляет около 6,7 mM.

В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет по меньшей мере около 5, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9 или около 8,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет примерно от 5,0 до 8,0, примерно от 5,5 до 6,5, примерно от 6,0 до 7,0, примерно от 6,5 до 7,5. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 7,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 6,2. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 6,6. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет около 5,5.

В некоторых вариантах осуществления композиция согласно изобретению, кроме того, содержит объемообразующий агент. Объемообразующий агент может быть выбран из группы, состоящей из NaCl, маннита, глицина, аланина и любой их комбинации. В других вариантах осуществления композиция согласно изобретению содержит стабилизирующий агент. Стабилизирующий агент может быть выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, раффинозы, аргинина; или любой их комбинации. В других вариантах осуществления композиция согласно изобретению содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из полисорбата 80 (PS80), полисорбата 20 (PS20) и любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления композиция, кроме того, содержит хелатирующий агент. Хелатирующий агент может быть выбран из группы, состоящей из диглицерилтриаминпентауксусной кислоты (DTPA), этилендиаминтетрауксусной кислоты, нитрилотриуксусной кислоты и любой их комбинации.

В одном варианте осуществления композиция содержит NaCl, маннит, пентетовую кислоту (DTPA), сахарозу, PS80 и любую их комбинацию. В другом варианте осуществления композиция содержит NaCl при концентрации по меньшей мере около 5 mM, по меньшей мере около 10 mM, по меньшей мере около 15 mM, по меньшей мере около 20 mM, по меньшей мере около 25 mM, по меньшей мере около 30 mM, по меньшей мере около 35 mM, по меньшей мере около 40 mM, по меньшей мере около 45 mM, по меньшей мере около 50 mM, по меньшей мере около 60 mM, по меньшей мере около 70 mM, по меньшей мере около 75 mM, по меньшей мере около 80 mM, по меньшей мере около 90 mM, по меньшей мере около 100 mM, по меньшей мере около 110 mM, по меньшей мере около 120 mM, по меньшей мере около 130 mM, по меньшей мере около 140 mM, по меньшей мере около 150 mM, по меньшей мере около 175 mM, по





около 3% маннита (или 3% маннита  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%) и около 0,02% PS80 (или 0,02% PS80  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), при pH около 6,5. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 мМ цитратном буфере (или 20 мМ цитратном буфере  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), содержащем около 100 мМ NaCl (или 100 мМ NaCl  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), около 100 мкМ DTPA (или 100 мкМ DTPA  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), около 1,0% маннита (или 1,0% маннита  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%) и около 0,02% PS80 (или 0,02% PS80  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), при pH около 6,5. В еще других вариантах осуществления композиция содержит ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:1 в примерно 20 мМ цитратном буфере (или 20 мМ цитратном буфере  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), содержащем около 50 мМ NaCl (или 50 мМ NaCl  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), около 100 мкМ DTPA (или 100 мкМ DTPA  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), около 6% сахарозы (или 6% сахарозы  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%) и около 0,02% PS80 (или 0,02% PS80  $\pm$  10%, 20%, 30%, 40% или 50%), при pH около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:3, содержит около 4,62 мг/мл ниволумаба, около 1,54 мг/мл ипилимумаба, около 18,5 мМ Трис-гидрохлорида, около 1,5 мМ дигидрата цитрата натрия, около 96,2 мМ NaCl, около 1,2% маннита, около 93,9 мкМ пентетовой кислоты и около 0,012% PS80 при pH около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая ниволумаб и ипилимумаб в соотношении 1:3, содержит около 4,61 мг/мл ниволумаба, около 1,54 мг/мл ипилимумаба, около 18,46 мМ Трис-гидрохлорида, около 1,54 мМ дигидрата цитрата натрия, около 96,15 мМ NaCl, около 1,15% маннита, около 93,85 мкМ пентетовой кислоты и около 0,012% PS80 при pH около 6,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит 30 мг ниволумаба и 90 мг ипилимумаба на флакон. В других вариантах осуществления композиция содержит 40 мг ниволумаба и 120 мг ипилимумаба на флакон.

В других вариантах осуществления композиция содержит третье антитело. В некоторых вариантах осуществления третье антитело представляет собой любое антитело, описанное в настоящем документе.

#### Стабильность композиций.

В одном варианте осуществления композиция, раскрытая здесь, является стабильной при температуре около 0°C, около 5°C, около 10°C, около 15°C, около 20°C, около 25°C, около 30°C, около 35°C, около 40°C, около 45°C, около 50°C или около 55°C в течение по меньшей мере около 1 недели, по меньшей мере около 2 недель, по меньшей мере около 1 месяца, по меньшей мере около 2 месяцев, по меньшей мере около 3 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 9 месяцев, по меньшей мере около 1 года, по меньшей мере около 2 лет или по меньшей мере около 5 лет.

В другом варианте осуществления композиция проявляет изменение кислотного пика (например, дезамидирование), которое составляет менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% после хранения в течение около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года при температуре около 5°C. В других вариантах осуществления композиция проявляет изменение кислотного пика, которое составляет менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% после хранения в течение около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года при температуре около 25°C. В некоторых вариантах осуществления композиция проявляет изменение кислотного пика, которое составляет менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% после хранения в течение около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года при температуре около 40°C. В некоторых вариантах осуществления кислотный пик измеряют с помощью анализа методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF).

В некоторых вариантах осуществления дезамидирование композиции согласно настоящему изобретению сопоставимо с дезамидированием референсной композиции (композиции, содержащей первое антитело или второе антитело), если композиция проявляет изменение кислотного пика (например, дезамидирование), составляющее менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% по сравнению с кислотным пиком референсной композиции.

В определенных вариантах осуществления композиция проявляет изменение высокомолекулярного (HMW) пика (например, агрегация), которое составляет менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% после хранения в течение около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года при температуре около 5°C. В некоторых вариантах осуществления композиция проявляет изменение HMW пика, которое составляет менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% после хранения в течение около 1 месяца, около



около 0,4%, около 0,3%, около 0,2% или около 0,1% после хранения в течение около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 6 месяцев или около 1 года при температуре около 5°C, около 25°C или около 40°C. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярный пик измieniaют методом хроматографии. В некоторых вариантах осуществления хроматография представляет собой эксклюзационную хроматографию.

В некоторых вариантах осуществления фрагментация (например, уровень содержания LMW фракций) композиции согласно настоящему изобретению сопоставима с фрагментацией референсной композиции (композиции, содержащей первое антитело или второе антитело), если композиция, содержащая первое и второе антитело, проявляет изменение LMW пика, составляющее менее чем около 15%, около 14%, около 13%, около 12%, около 11%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1% по сравнению с LMW пиком референсной композиции.

#### Способ изготовления композиций, раскрытых в документе.

В одном варианте осуществления изобретение направлено на способ изготовления любой композиции, раскрытой в настоящем документе. В другом варианте осуществления лекарственную форму, содержащую лекарственный препарат на основе анти-PD-1 антитела, смешивают с лекарственной формой, содержащей лекарственный препарат на основе второго антитела, для получения желаемого соотношения в конечном лекарственном препарате без замен буфера. В других вариантах осуществления конечная композиция содержится в Трис-цитратном буфере.

В некоторых вариантах осуществления лекарственную форму, содержащую фармацевтическую субстанцию на основе анти-PD-1 антитела, и лекарственную форму, содержащую фармацевтическую субстанцию на основе другого антитела, подвергают заменам буферов и/или концентрированию перед смешиванием для получения желаемого соотношения в конечном лекарственном препарате.

В других вариантах осуществления композицию разбавляют перед применением. В определенных вариантах осуществления композицию разбавляют перед применением 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций, USP, или 5% раствором декстрозы для инъекций, USP. В других вариантах осуществления композицию разбавляют с получением раствора для инфузии с желаемой концентрацией первого и второго антитела. В еще других вариантах осуществления конечная концентрация первого и второго антитела составляет примерно от 1 мг/мл до 500 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 450 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 400 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 350 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 300 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 250 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 200 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 150 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 100 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 90 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 80 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 70 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 60 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 50 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 40 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 30 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 20 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 15 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 10 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 9 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 8 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 7 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 6 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 5 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 4 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 3 мг/мл, примерно от 1 мг/мл до 2 мг/мл, примерно от 0,5 мг/мл до 3 мг/мл, примерно от 50 мг/мл до 400 мг/мл или примерно от 100 мг/мл до 300 мг/мл.

В определенных вариантах осуществления разбавленный инфузионный раствор хранят в течение не более чем около 10 ч, около 9 ч, около 8 ч, около 7 ч, около 6 ч, около 5 ч, около 4 ч, около 3 ч, около 2 ч или около 1 ч при комнатной температуре после разбавления. В некоторых вариантах осуществления разбавленный инфузионный раствор хранят в холодильнике (при температуре около 2°C-8°C) в течение не более чем около 1 недели, около 6 дней, около 5 дней, около 4 дней, около 3 дней, около 2 дней, около 1 дня или около 12 ч после разбавления.

#### Способы согласно изобретению

В данном изобретении предлагаются способы лечения субъекта, пораженного заболеванием или патологическим состоянием, с помощью любой композиции, раскрытой в настоящем документе. В одном варианте осуществления способ направлен на введение фармацевтической композиции, содержащей количество X первого антитела, которое представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело, и количество Y второго антитела, при этом количество первого антитела и количество второго антитела находится в фиксированном соотношении, составляющем примерно от 100:1 до 1:100.

В некоторых вариантах осуществления заболевания или патологическое состояние представляет собой инфекционное заболевание. В других вариантах осуществления заболевания или патологическое состояние представляет собой рак. В еще других вариантах осуществления рак представляет собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы и шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, карциному фалlopиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лим-

фобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидерmoidный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные условиями окружающей среды раковые заболевания, включая раковые заболевания, индуцированные асбестом, и любые комбинации указанных типов рака. В еще других вариантах осуществления рак представляет собой рак легких, метастатическую меланому, глиобластому или почечно-клеточную карциному.

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплоскоклеточный NSCLC, глиому, рак ЖКТ, рак почки (например, светлоклеточный рак), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (например, почечно-клеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормоно-рефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, неиробластому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультiformную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки, и рак головы и шеи (или карциному), рак желудочно-кишечного тракта, эмбрионально-клеточную опухоль, детскую саркому, синоназальный естественный киллер, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак кости, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичка, карциному фалlopиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак параситовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, рак мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазму нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидерmoidный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцированные условиями окружающей среды раковые заболевания, включая раковые заболевания, индуцированные асбестом, связанные с вирусом раковые заболевания (например, опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (ВПЧ)), и гематологические злокачественные опухоли, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, то есть линии миелоидных клеток (продуцирующей гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (продуцирующей В-, Т-, NK-клетки и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелогенный лейкоз (CML), недифференцированный лейкоз AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (вариант M3 или M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (вариант M4 или M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточная гематологическая злокачественная опухоль, например, В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитOIDНАЯ лимфома, моноцитоидная В-клеточная лимфома, лимфома, развивающаяся из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослого возраста, лимфома мантийных клеток, ангио-иммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома Т-клеток предшественников, Т-лимфобластная лимфома; и лимфомы/лейкозы (T-Lbly/T-ALL), такие как периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантиционное лимфопролиферативное нарушение, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная эфузивная лимфома, лимфобластная лимфома (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузная крупно-клеточная В-клеточная лимфома, лимфома Беркита, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (DHL), иммунобластная крупноклеточная лимфома, лимфобластная лимфома В-клеток предшественников, кожная Т-клеточная лимфома (CTLC) (также называемая грибовидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмацитOIDНАЯ лимфома (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома IgG, миелома легкой цепи, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая индолентной миеломой), одиночная плазмоцитома и множественные миеломы, хроническая лимфоцитарная лейкемия (CLL), волосато-клеточная лимфома; гематопоэтические опухоли миелоидной линии, опухоли мезенхимального происхождения, включая фиброзаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фиброзаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая, но без ограничения, Т-клеточные нарушения, такие как Т-

пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая мелкоклеточный и мозговидный клеточный тип; крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз (LGL), предпочтительно Т-клеточного типа; а/d Т-NHL печеночно-селезеночную лимфому; периферическую/посттимическую Т-клеточную лимфому (плеоморфные и иммунобластные подтипы); ангiocентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, ректальный рак, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных типов рака. Способы, описанные в настоящем документе, можно также применять для лечения метастатического рака.

В определенных вариантах осуществления композицию вводят с любым дополнительным противораковым агентом. В других вариантах осуществления противораковый агент представляет собой любой противораковый агент, известный в данной области. В еще других вариантах осуществления противораковый агент представляет собой третье антитело. В некоторых вариантах осуществления третье антитело представляет собой любое антитело, раскрытое в настоящем документе.

В других вариантах осуществления композицию вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления композицию восстанавливают перед введением. В еще других вариантах осуществления композицию разбавляют перед введением. В конкретном варианте осуществления композицию вводят в постоянной дозе. В других вариантах осуществления композицию вводят в дозе на основе массы тела.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят по меньшей мере примерно один раз в неделю, по меньшей мере примерно два раза в неделю, по меньшей мере примерно каждые две недели, по меньшей мере примерно каждые три недели или по меньшей мере примерно каждый месяц. В некоторых вариантах осуществления лечение продолжают в течение по меньшей мере около 4 недель, по меньшей мере около 8 недель, по меньшей мере около 12 недель, по меньшей мере около 3 месяцев, по меньшей мере около 6 месяцев, по меньшей мере около 9 месяцев, по меньшей мере около 1 года, по меньшей мере около 18 месяцев, по меньшей мере около 2 лет или более 2 лет.

В некоторых вариантах осуществления изобретение направлено на способ модулирования иммунного ответа, включающий введение любой композиции, раскрытой в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления композиция согласно настоящему изобретению (например, введение анти-PD-1 антитела или введение анти-PD-1 антитела и другой противораковой терапии) эффективно увеличивает продолжительность выживания субъекта. Например, продолжительность выживания субъекта увеличивается по меньшей мере на около 1 месяц, по меньшей мере на около 2 месяца, по меньшей мере на около 3 месяца, по меньшей мере на около 4 месяца, по меньшей мере на около 5 месяцев, по меньшей мере на около 6 месяцев, по меньшей мере на около 7 месяцев, по меньшей мере на около 8 месяцев, по меньшей мере на около 9 месяцев, по меньшей мере на около 10 месяцев, по меньшей мере на около 11 месяцев или по меньшей мере на около 1 год или более по сравнению с другим субъектом, подвергаемым лечению только другим видом терапии (например, стандартная терапия) или только одним из двух компонентов композиции (например, только анти-PD-1 антитело). В некоторых вариантах осуществления продолжительность выживания увеличивается по меньшей мере на около 2 месяца. В определенных вариантах осуществления терапия согласно настоящему изобретению эффективно увеличивает продолжительность выживания субъекта без прогрессирования заболевания. Например, выживаемость субъекта без прогрессирования заболевания увеличилась по меньшей мере на около 1 месяц, по меньшей мере на около 2 месяца, по меньшей мере на около 3 месяца, по меньшей мере на около 4 месяца, по меньшей мере на около 5 месяцев, по меньшей мере на около 6 месяцев, по меньшей мере на около 7 месяцев, по меньшей мере на около 8 месяцев, по меньшей мере на около 9 месяцев, по меньшей мере на около 10 месяцев, по меньшей мере на около 11 месяцев или по меньшей мере на около 1 год по сравнению с субъектом, не подвергнутым лечению, или субъектом, подвергнутым лечению только другой терапией (например, стандартная терапия) или только одним из двух компонентов композиции (например, только анти-PD-1 или анти-PD-L1 антитело). В некоторых вариантах осуществления выживание без прогрессирования заболевания увеличилось по меньшей мере на около 2 месяца. В определенных вариантах осуществления терапия согласно настоящему изобретению эффективно повышает частоту ответа в группе субъектов. Например, частота ответа в группе субъектов увеличилась по меньшей мере на около 2%, по меньшей мере на около 3%, по меньшей мере на около 4%, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 15%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 25%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 35%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 45%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 55%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 75%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% по сравнению с другой группой субъектов, подвергнутых лечению только другой терапией (например, стандартная терапия) или только одним из двух компонентов композиции (например, только анти-PD-1 антитело), то есть монотерапии.

Дозы композиций, раскрытых в документе.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в постоянной дозе независимо от массы тела пациента. Например, анти-PD-1 антитело со вторым антителом можно вводить в постоянной дозе,

составляющей 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 50, 75, 80, 200, 240, 300, 360, 400, 480, 500, 750 или 1500 мг, или любой другой дозе, раскрытой здесь, независимо от массы тела пациента. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят в дозе на основе массы тела при любой дозе, раскрытой здесь. В некоторых вариантах осуществления количества первого антитела и количество второго антитела, вводимое пациенту в виде единичной дозы, идентично количеству X и количеству Y, соответственно.

В определенных вариантах осуществления способов комбинированной терапии согласно настоящему изобретению терапевтически эффективная доза анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающей части составляет 60 мг, около 80 мг, около 100 мг, около 120 мг, около 140 мг, около 160 мг, около 180 мг, около 200 мг, около 220 мг, около 240 мг, около 260 мг, около 280 мг или около 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающей части составляет около 310 мг, около 320 мг, около 330 мг, около 340 мг, около 350 мг, около 360 мг, около 370 мг, около 380 мг, около 390 мг, около 400 мг, около 410 мг, около 420 мг, около 430 мг, около 440 мг, около 450 мг, около 460 мг, около 470 мг, около 480 мг, около 490 мг или около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет примерно от 60 мг до 300 мг, примерно от 60 мг до 100 мг, примерно от 100 мг до 200 мг или примерно от 200 мг до 300 мг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет примерно от 300 мг до 500 мг, примерно от 300 мг до 450 мг, примерно от 300 мг до 400 мг, примерно от 300 мг до 350 мг, примерно от 350 мг до 500 мг, примерно от 400 мг до 500 мг или примерно от 450 мг до 500 мг. В некоторых вариантах осуществления количества анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 80 мг, около 160 мг или около 240 мг. В определенных вариантах осуществления количества анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 360 мг или 480 мг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 240 мг или по меньшей мере около 80 мг. В одном варианте осуществления количества анти-PD-1 антитела в композиции составляет около 360 мг. В другом варианте осуществления количества анти-PD-1 антитела в композиции составляет около 480 мг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 0,5 мг/кг, по меньшей мере около 1 мг/кг, по меньшей мере около 2 мг/кг, по меньшей мере около 3 мг/кг или по меньшей мере около 5 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет примерно от 0,5 мг/кг до 5 мг/кг, примерно от 0,5 мг/кг до 5 мг/кг, примерно от 0,5 мг/кг до 3 мг/кг или примерно от 0,5 мг/кг до 2 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления доза анти-PD-1 антитела в композиции составляет по меньшей мере около 1 мг/кг. Соответствующую дозу второго антитела рассчитывают с использованием желаемого соотношения.

В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело вводят в субтерапевтической дозе, то есть дозе терапевтического агента, которая значительно ниже обычной или одобренной FDA дозы, в случае введения в виде монотерапии для лечения рака. Количество второго антитела в композиции рассчитывают исходя из желаемого соотношения. Дозы ниволумаба, которые ниже типичной дозы 3 мг/кг, но не ниже 0,001 мг/кг, являются субтерапевтическими дозами. Субтерапевтические дозы анти-PD-1 антитела, применяющиеся в способах согласно настоящему документу, представляют собой дозы выше 0,001 мг/кг и ниже 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза составляет примерно от 0,001 мг/кг до 1 мг/кг, примерно от 0,01 мг/кг до 1 мг/кг, примерно от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг или примерно от 0,001 мг/кг до 0,1 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления субтерапевтическая доза составляет по меньшей мере около 0,001 мг/кг, по меньшей мере около 0,005 мг/кг, по меньшей мере около 0,01 мг/кг, по меньшей мере около 0,05 мг/кг, по меньшей мере около 0,1 мг/кг, по меньшей мере около 0,5 мг/кг или по меньшей мере около 1,0 мг/кг массы тела. Данные по занятости рецепторов, полученные от 15 субъектов, которые получали ниволумаб в дозе от 0,3 мг/кг до 10 мг/кг, указывают на то, что занятость PD-1 оказалась дозо-зависимой в этом диапазоне доз. Для всех доз показатель средней занятости составил 85% (диапазон от 70% до 97%) со средним плато занятости 72% (диапазон от 59% до 81%). В некоторых вариантах осуществления доза 0,3 мг/кг может обеспечить достаточное воздействие, приводящее к максимальной биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем внутривенной инфузии один раз примерно в неделю, один раз примерно каждые 2 недели, один раз примерно каждые 3 недели или один раз примерно в месяц. В определенных вариантах осуществления композицию вводят один раз примерно каждые 3 недели. В одном варианте осуществления 360 мг анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вводят один раз каждые 3 недели. В другом варианте осуществления 480 мг анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента вводят один раз примерно каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления инфузию проводят в течение по меньшей мере около 10 мин, около 20 мин, около 30 мин, около 45 мин, около 60 мин, около 90 мин, около 2 ч, около 3 ч, около 4 ч или около 5 ч.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут быть постоянными или варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без проявления токсичности у

пациента. Выбранный уровень доз будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных используемых композиций согласно настоящему изобретению, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с применяемыми конкретными композициями, возраст, пол, массу тела, патологическое состояние, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Композицию согласно настоящему изобретению можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких различных способов, известных в данной области. Специалисту в данной области будет понятно, что путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов.

#### Наборы.

В объем настоящего изобретения входят также наборы, содержащие композиции анти-PD-1 антитела/второго антитела и инструкции для терапевтического применения. Наборы обычно содержат этикетку, указывающую предполагаемое применение содержимого данного набора и инструкции по применению. Термин "этикетка" включает любое описание или записанный материал, поставляемый с набором, или материал, который иным образом прилагается к набору. Таким образом, данное изобретение обеспечивает набор, содержащий: (a) соответствующую дозу композиции, раскрытой здесь, и (b) инструкции по применению композиции в любом из способов, раскрытых в настоящем документе.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не должны рассматриваться как дополнительное ограничение. Содержание всех цитируемых ссылок включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Примеры

Несколько анализов осуществимости изобретения "Feasibility Studies" выполняли для оценки стабильности ипилимумаба и ниволумаба в единой лекарственной форме, содержащей комбинацию с фиксированным соотношением доз (FDRC). На фиг. 1 показаны лекарственные формы ипилимумаба и ниволумаба в виде составов их фармацевтических субстанций (Drug Substance, DS) или лекарственных препаратов (Drug Product DP), которые использовали в следующих примерах в качестве контролей в тех случаях, где это указано.

#### Пример 1.

Анализ осуществимости изобретения выполняли для оценки стабильности ипилимумаба и ниволумаба в единой лекарственной форме, содержащей комбинацию с фиксированным соотношением доз (FDRC), изготовленной путем смешивания индивидуальных лекарственных форм ипилимумаба и ниволумаба (фиг. 1) до конечного соотношения ипилимумаба к ниволумабу, равного 1:1.

DP ипилимумаб (BMS-734016) содержит 5 мг/мл ипилимумаба в 20 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl, 1,0% (мас./об.) маннита, 100 мКМ пентетовой кислоты (DTPA) и 0,01% полисорбата 80 (PS80) при pH 7,0, и представлено в виде 40 мл во флаконе объемом 50 мл и 10 мл во флаконе объемом 10 мл (фиг. 1). DP ниволумаб (BMS-936558) содержит 10 мг/мл ниволумаба в 20 мМ цитратном буфере (дигидрат цитрата натрия), 50 мМ NaCl, 3,0% (мас./об.) маннита, 20 мКМ DTPA и 0,02% PS80 при pH 6,0, и представлено в виде 10 мл во флаконе объемом 10 мл (фиг. 1).

Для достижения соотношения 1:1 ипилимумаба к ниволумабу 80 мл DP ипилимумаба (2 флакона) смешивали с 40 мл DP ниволумаба (4 флакона) с получением объединенного продукта, содержащего 3,3 мг/мл ипилимумаба и 3,3 мг/мл ниволумаба. Полученная лекарственная форма FDRC содержала 13,3 мМ Трис-HCl, 6,7 мМ цитрата, 83,3 мМ NaCl, 1,67% (мас./об.) маннита, 73,3 мКМ DTPA и 0,013% мас./об. PS80 при pH 6,2, как показано в табл. 1.

Таблица 1

#### Объединенная лекарственная форма EC FDRC (1:1)

Прототип	Соотн.	Конечная конц. во	Трис	Цитрат	рН	Маннит	NaCl	DTPA	PS80	
		флаконе (мг/мл)	мМ	мМ		%масса/объем	мМ	мКМ	%масса/объем	
1	1:1	3,3	3,3	13,3	6,7	6,2	1,67	83,3	73,3	0,013

Лекарственную форму, содержащую FDRC (1:1), отфильтровывали и разделяли на аликовты в 10 cc стеклянные флаконы (по 5 мл на флакон), закрывали пробкой и герметизировали. Затем флаконы хранили при температуре 5°C или 40°C. Образцы анализировали на дни 0, через 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца и 6 месяцев. Образцы на день 0 использовали в качестве контролей.

#### Анализ образов. Способы.

В каждый момент времени содержащие образцы флаконы оценивали по внешнему виду, pH при комнатной температуре, HIAC, методом эксклюзационной хроматографии и капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF). Счетчик HIAC (Royco) представляет собой прибор, предназначенный для

измерения размера твердых частиц в жидкости методом затенения.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) выполняли с помощью аналитической эксклюзионной HPLC (SE-HPLC) с использованием колонки TSKgel® G3000SW<sub>XL</sub> с предколонкой TSKgel® Guard SW<sub>XL</sub> на хроматографе Alliance® 2695 HPLC с двухволновым ультрафиолетовым (УФ) детектором 2497 (Waters®) с использованием программного продукта Empower™ 2 Software. Для уравновешивания системы использовали 0,1 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 М Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 15%-ный ацетонитрил (ACN) при pH 6,8 (подвижная фаза). Образцы анализировали в неразбавленном виде, если концентрация не превышала 125 мг/мл. Если концентрация превышала 125 мг/мл, образец разбавляли до 50 мг/мл соответствующим буфером. Образцы переносили в HPLC виалы перед анализом и хранили в аналитической системе HPLC при температуре 5°C ± 3°C. В общей сложности 100 мкг образца инжектировали для анализа и элюировали изократически при температуре колонки 22°C с использованием подвижной фазы. Скорость потока составила 1,0 мл/мин при времени элюирования на образец 20 мин и длине волны детектора 280 нм.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (cIEF) выполняли с использованием системы Protein Simple™ iCE3 с пробоотборником Alcott. Образцы анализировали при концентрации 25 мг/мл с 2 М мочевиной и 0,35% метилцеллюлозой (МС). Для разделения использовали капилляр 50 мм с внутренним диаметром 100 мкм. Раствор электролита представлял собой 80 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в 0,1% МС, и раствор католита представлял собой 100 mM NaOH в 0,1% МС. Амфоролиты-носители представляли собой 1% Pharmalyte® 5-8 и 3% Pharmalyte® 8-10.5. Время фокусировки составило 13 мин с приложением фокусирующего напряжения 1,5 кВ (300 В/см) в течение первой минуты с последующим напряжением 3 кВ (600 В/см) в течение остальных 12 мин. Детекцию выполняли при 280 нм.

#### Анализ образцов. Результаты.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) выполняли на контролях DP ниволумабе и DP ипилимумабе, и лекарственной форме, содержащей комбинацию с фиксированным соотношением доз (ЕС FDRC (1:1)), после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 2A). Размер HMW пика контрольного DP ниволумаба увеличился примерно на 1,6%, и размер HMW пика контрольного DP ипилимумаба увеличился примерно на 0,25% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 2A). Размер HMW пика лекарственной формы, содержащей ЕС FDRC (1:1), увеличился примерно на 0,7% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 2A). После хранения в течение 6 месяцев при 40°C размер HMW пика лекарственной формы, содержащей ЕС FDRC (1:1), увеличился с 0,555% до конечного размера HMW пика, составляющего 2,82%, при этом увеличение составило примерно 2,265% (табл. 2). После хранения в течение 6 месяцев при 5°C размер HMW пика лекарственной формы, содержащей ЕС FDRC (1:1), уменьшился с 0,555% до конечного размера HMW пика, составляющего 0,525% (табл. 2).

Таблица 2

Результаты анализа объединенной лекарственной  
формы, содержащей ЕС FDRC (1:1), методом капиллярного  
изоэлектрического фокусирования и эксклюзионной хроматографии

Лекарств. средство	cIEF Кислот- ный пик (Исх)	cIEF Кислот- ный пик (6 мес/ 5°C)	cIEF Кислот- ный пик (Измен. при 5°C)	SEC HMW Исх	SEC HMW 6 мес/ 40°C	SEC HMW 6 мес/ 5°C	SEC HMW Измен. при 40°C	SEC HMW Измен. при 5°C
Ипилимумаб	34	38,16	4,16	0,555	2,82	0,525	2,265	-0,03
Ниволумаб	35,09	38,65	3,56					

cIEF выполняли на контролях DP ниволумабе и DP ипилимумабе, и лекарственной форме, содержащей ЕС FDRC (1:1), после хранения в течение 6 месяцев при 5°C (фиг. 2B). Размер кислотного пика контрольного DP ниволумаба увеличился примерно на 1,3%, и размер кислотного пика контрольного DP ипилимумаба увеличился примерно на 3% после хранения в течение 6 месяцев при 5°C (фиг. 2B). Для лекарственной формы, содержащей ЕС FDRC (1:1), размер кислотного пика ниволумаба увеличился примерно на 3,56%, то есть с 35,09% на день-0 (исходное значение) до 38,65% через 6 месяцев, тогда как размер кислотного пика ипилимумаба увеличился примерно на 4,16%, то есть с 34% на день-0 (исходное значение) до 38,16% через 6 месяцев (табл. 2 и фиг. 2B).

Данное исследование можно использовать в широком диапазоне концентраций смешанной буферной системы, то есть Трис-цитратной буферной композиции.

#### Пример 2.

Исследование осуществимости изобретения выполняли для оценки стабильности ипилимумаба/ниволумаба в лекарственной форме, содержащей FDRC, полученной путем смешивания индивидуальных лекарственных форм ипилимумаба и ниволумаба до конечных соотношений 3:1, 1:1 и 1:3 (табл. 3). Лекарственные формы, содержащие FDRC, изготавливали путем смешивания DS ипилимумаба при 5 мг/мл и DS ниволумаба при 20 мг/мл до соотношения белков 3:1, 1:1 и 1:3 (табл. 3).

Каждый объединенный раствор затем перемешивали с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре в течение 30 мин, переносили во флаконы и хранили до анализа стабильности во времени. Флаконы хранили при 5°C, 25°C и 40°C до 12 месяцев.

Таблица 3

EC FDRC (3:1; 1:1; 1:3) - комбинации лекарственных форм, содержащих DP ипилимумаб и DP ниволумаб

Прототип	Соотн. .	Конечн.конц. во флаконе (мг/мл)		рН	Маннит	NaCl	DTPA	PS 80
		Ипи	Ниво					
EC: pH 6,6	<b>3:1</b>	4,62	1,54	6,6	1,15	96,15	93,85	0,012
EC: pH 6,0	<b>1:3</b>	2,86	8,57	6,0	1,86	78,57	65,71	0,023
EC: pH 6,2	<b>1:1</b>	4,00	4,00	6,2	1,67	83,33	73,33	0,013

Прототип EC: pH 6,6 при соотношении ипилимумаба к ниволумабу 3:1 содержал 4,62 мг/мл ипилимумаба, 1,54 мг/мл ниволумаба, 1,15% мас./об. маннита, 96,15 мМ NaCl, 93,85 мкМ DTPA и 0,012% мас./об. PS80 при pH 6,6. Прототип EC: pH 6,0 при соотношении ипилимумаба к ниволумабу 1:3 содержал 2,86 мг/мл ипилимумаба, 8,57 мг/мл ниволумаба, 1,86% мас./об. маннита, 78,57 мМ NaCl, 65,71 мкМ DTPA и 0,023% мас./об. PS80 при pH 6,0. Прототип EC: pH 6,2 при соотношении ипилимумаба к ниволумабу 1:1 содержал 4,00 мг/мл ипилимумаба, 4,00 мг/мл ниволумаба, 1,67% мас./об. маннита, 83,33 мМ NaCl, 73,33 мкМ DTPA и 0,013% мас./об. PS80 при pH 6,2.

#### Анализ методом SEC.

В целом, незначительные увеличения HMW и LMW фракций наблюдались во всех 3 прототипах (3А, В). Эксклюзационную хроматографию (SEC) выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах, содержащих EC FDRC, EC: pH 6,0 (1:3), EC: pH 6,2 (1:1) и EC: pH 6,6 (3:1) после хранения в течение 2 месяцев при 40°C (фиг. 3А и 3В). Лекарственная форма контрольного ипилимумаба имела исходный размер HMW пика, составляющий около 0,4% на день 0, который увеличился примерно на 0,1% до конечного размера HMW пика, составляющего более 0,5% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3А). Лекарственная форма контрольного ниволумаба имела исходный размер HMW пика около 0,8% на день 0, который увеличился примерно на 0,7% до конечного размера HMW пика, составляющего более 1,5% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3А). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,0 (1:3) имела исходный размер HMW пика около 0,6% на день 0, который увеличился примерно на 0,7% до конечного размера HMW пика, составляющего около 1,3% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3А). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,2 (1:1) имела исходный размер HMW пика около 0,5% на день 0, который увеличился примерно на 0,5% до конечного размера HMW пика, составляющего около 1,0% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3А). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,6 (3:1) имела исходный размер HMW пика около 0,5% на день 0, который увеличился примерно на 0,3% до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,8% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3А).

Размеры низкомолекулярных (LMW) пиков для различных лекарственных форм также измеряли на день 0, через 2 месяца хранения при 40°C и через 3 месяца хранения при 25°C (фиг. 3В). Лекарственная форма контрольного ипилимумаба имела исходный размер LMW пика около 0,2% на день 0, который увеличился примерно на 0,65% до конечного размера LMW пика, составляющего около 0,85% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3В). После хранения при 25°C в течение 3 месяцев размер LMW пика лекарственной формы контрольного ипилимумаба увеличился примерно на 0,1% (фиг. 3В). Лекарственная форма контрольного ниволумаба имела исходный размер LMW пика около 0,2% на день 0, который увеличился примерно на 0,6% до конечного размера LMW пика, составляющего около 0,8% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3В). После хранения при 25°C в течение 3 месяцев размер LMW пика лекарственной формы контрольного ниволумаба увеличился на менее чем 0,1% (фиг. 3В). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,0 (1:3) имела исходный размер LMW пика около 0,15% на день 0, который увеличился примерно на 0,8% до конечного размера LMW пика, составляющего около 0,95% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3В). После хранения при 25°C в течение 3 месяцев размер LMW пика лекарственной формы FDRC EC: pH 6,0 (1:3) увеличился примерно на 0,2% (фиг. 3В). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,2 (1:1) имела исходный размер LMW пика около 0,15% на день 0, который увеличился примерно на 1,2% до конечного размера LMW пика, составляющего около 1,35% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3В). После хранения при 25°C в течение 3 месяцев размер LMW пика лекарственной формы FDRC EC: pH 6,2 (1:1) увеличился примерно на 0,3% (фиг. 3В). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,6 (3:1) имела исходный размер LMW пика около 0,15% на день 0, который увеличился примерно на 1,5% до конечного размера LMW пика, составляющего около 1,65% через 2 месяца хранения при 40°C (фиг. 3В). После хранения при 25°C в течение 3 месяцев размер LMW пика лекарственной формы FDRC

EC: pH 6,6 (3:1) увеличился примерно на 0,1%.

Анализ методом cIEF.

cIEF выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах, содержащих EC FDRC, EC: pH 6,0 (1:3), EC: pH 6,2 (1:1) и EC: pH 6,6 (3:1) после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4A), 3 месяцев при 5°C (фиг. 4B) и 1 месяца при 25°C (фиг. 4C). Размер кислотного пика контрольного DP ниволумаба уменьшился примерно на 0,05%, и размер кислотного пика контрольного DP ипилимумаба увеличился примерно на 5,59% после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,0 (1:3) увеличились примерно на 5% и примерно на 5,7%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,2 (1:1) увеличились примерно на 6,8% и примерно на 6,3%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,6 (3:1) увеличились примерно на 4% и примерно на 7,8%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 4A). Во всех трех лекарственных формах FDRC размер кислотного пика ипилимумаба увеличился примерно на 5,7%-8%, или в среднем примерно на 2,2% за месяц, и размер кислотного пика ниволумаба увеличился примерно на 4%-6,8%, или в среднем менее чем на 2% (около 1,76%) за месяц (фиг. 4A).

На фиг. 4В показано фактическое изменение размера кислотного пика относительно исходных (день 0) контролей для образцов, хранящихся в течение 3 месяцев при 5°C, с использованием анализа методом cIEF. Размер кислотного пика контрольного DP ниволумаба уменьшился примерно на 5,1%, и размер кислотного пика контрольного DP ипилимумаба уменьшился примерно на 1% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 4B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,0 (1:3) увеличились примерно на 0,1% и уменьшились примерно на 1,5%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 4B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,2 (1:1) увеличились примерно на 2,1% и примерно на 0,5%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 4B). Лекарственная форма FDRC EC: pH 6,6 (3:1) показала отсутствие изменения размера кислотного пика ипилимумаба и уменьшение, составляющее менее 0,1%, размера кислотного пика ниволумаба после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 4B).

На фиг. 4С показано фактическое изменение размера кислотного пика относительно исходных (день 0) контролей для образцов, хранящихся в течение 1 месяца при 25°C. Размер кислотного пика контрольного DP ниволумаба увеличился примерно на 1,05%, и размер кислотного пика контрольного DP ипилимумаба увеличился примерно на 1,16% после хранения в течение 1 месяца при 25°C (фиг. 4C). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,0 (1:3) увеличились примерно на 2,8% и примерно на 1%, соответственно, после хранения в течение 1 месяца при 25°C (фиг. 4C). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,2 (1:1) увеличились примерно на 3,1% и примерно на 1,6%, соответственно, после хранения в течение 1 месяца при 25°C (фиг. 4C). Размер кислотного пика ниволумаба лекарственной формы FDRC EC: pH 6,6 (3:1) не изменился, и размер кислотного пика ипилимумаба увеличился примерно на 2,8% после хранения в течение 1 месяца при 25°C (фиг. 4C).

Пример 3.

Исследование с применением планирования экспериментов (Design of Experiments, DoE) выполняли для идентификации новых кандидатных лекарственных форм ипилимумаба/ниволумаба. Прототипы лекарственных форм, содержащих FDRC (3:1) ипилимумаба/ниволумаба, изготавливали в выбранных гистидиновых или цитратных буферных системах, как показано в табл. 4. Все прототипы DoE FDRC получали при конечной концентрации ипилимумаба/ниволумаба 10 мг/мл в соотношении 3:1 (табл. 4). Прототип FDRC "Combo 4" содержал 20 mM цитрата, 50 mM NaCl, 50 мкM DTPA, 6% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. PS80 при теоретическом значении pH, равном 6. Прототип FDRC "Combo 5" содержал 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 50 мкM DTPA, 6% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. PS80 при теоретическом значении pH, равном 6,0. Прототип FDRC "Combo 6" содержал 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 50 мкM DTPA, 6% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. PS80 при теоретическом значении pH, равном 6,0. Прототип FDRC "Combo New" содержал 20 mM гистидина, 50 мкM DTPA, 8,5% мас./об. сахарозы и 0,05% мас./об. PS80 при теоретическом значении pH, равном 6. Прототип FDRC "Combo 8", сходный с существующей лекарственной формой DP ниволумаба, содержал 20 mM цитрата, 50 mM NaCl, 20 мкM DTPA, 3% мас./об. маннита и 0,04% мас./об. PS80 при теоретическом значении pH, равном 6.

Таблица 4

## DoE FDRC (3:1) - новые лекарственные формы

Прототип (3:1)	pH	20 мМ буфер	Конц., мг/мл	NaCl, мМ	DTPA, мкМ	Сахароза, %масса/ объем	Маннит, %масса/ объем	PS80, %масса/ объем
Combo 4	6	Цитрат	10	50	50	6	-	0,05
Combo 5	6	Гистидин	10	50	50	6	-	0,05
Combo 6	7	Гистидин	10	50	50	6	-	0,05
Combo new	6	Гистидин	10	-	50	8,5	-	0,05
Combo 8	6	Цитрат	10	50	20	-	3	0,04

Лекарственные формы DoE FDRC получали в соответствии со следующим примером получения Combo New. Сначала Combo New получали путем подвергания DS ипилимумаба и DS ниволумаба (ELN 96488-024 и -025) ультрафильтрации/диафильтрации. В частности, для DS ниволумаба и DS ипилимумаба использовали одноразовую кассету для ультрафильтрации/диафильтрации (UFDF). Около 250 мл исходной DS ниволумаба (~21 мг/мл) использовали для UF/DF в режиме диафильтрации/концентрирования. Трансемембранные давление (TMP) устанавливали при 15 psi, при этом скорость потока 0,3 л/мин устанавливали для питающего насоса. Диафильтрацию завершали после использования 3 л буфера. Затем образец в сосуде концентрировали на основе расчетного снижения массы и собирали в колбе объемом 250 мл из PETG. Концентрация ниволумаба после ультрафильтрации/диафильтрации (UFDF) составила 30,6 мг/мл. Около 500 мл исходной DS ипилимумаба (~5,2 мг/мл) использовали для UF/DF в режиме диафильтрации/концентрирования. Концентрация ипилимумаба в конечном продукте составила 16,2 мг/мл по A280.

Затем 20 мл DS ипилимумаба в буфере на основе гистидина-сахарозы и 7,5 мл DS ниволумаба в буфере на основе гистидина-сахарозы добавляли в устройства D-Tube Dialyzer и подвергали диализу против буфера Combo New, указанного в табл. 4, в течение 24 ч в холодном помещении с использованием достаточного объема (3 замены буфера). Затем измеряли белковую концентрацию ипилимумаба и ниволумаба с помощью НПАС. Затем добавляли дополнительное количество DS ипилимумаба и/или DS ниволумаба и соответствующие буфера для доведения конечной концентрации ипилимумаба до 7,5 мг/мл и ниволумаба до 2,5 мг/мл (3:1). Остальные прототипы Combo 4, Combo 5, Combo 6 и Combo 8 получали таким же способом, как Combo New, модифицировали до определенных концентраций, указанных в табл. 5.

Объединенные лекарственные формы DP затем отфильтровывали и стерильно заполняли во 10 cc флаконы (SAP #1215125, партия #2L68780), закрывали крышкой (SAP #1239068, партия #0H49862) и обжимали. Некоторые флаконы оставляли для контрольного анализа на день 0. Остальные помещали в стабильные условия при 5°C, 25°C и 40°C до анализа в определенные моменты времени.

## Анализ методом SEC.

SEC выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах DoE FDRC (3:1) Combo New, Combo 4, Combo 5, Combo 6 и Combo 8 после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма контрольного ипилимумаба имела исходный размер HMW пика около 0,4% на день 0, который увеличился примерно на 0,2% до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,6% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма контрольного ниволумаба имела исходный размер HMW пика около 0,7% на день 0, который увеличился примерно на 1,6% до конечного размера HMW пика, составляющего около 2,4% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма FDRC Combo New имела исходный размер HMW пика около 0,4% на день 0, который увеличился примерно на 0,1% до конечного размера HMW пика, составляющего более 0,5% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма FDRC Combo 4 имела исходный размер HMW пика около 0,6% на день 0, который увеличился примерно на 0,7% до конечного размера HMW пика, составляющего около 1,3% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма FDRC Combo 5 имела исходный размер HMW пика менее чем 0,5% на день 0, который увеличился примерно на 0,3% до конечного размера HMW пика, составляющего менее чем 0,8% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма FDRC Combo 6 имела исходный размер HMW пика около 0,5% на день 0, который увеличился примерно на 0,3% до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,8% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А). Лекарственная форма FDRC Combo 8 имела исходный размер HMW пика около 0,5% на день 0, который увеличился примерно на 1,0% до конечного размера HMW пика, составляющего около 1,5% через 3 месяца хранения при 40°C (фиг. 5А).

Те же самые лекарственные формы анализировали методом SEC после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5А). Размер HMW пика лекарственной формы контрольного ипилимумаба и лекарственной формы контрольного ниволумаба, каждого, увеличился на 0,1% или менее после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5А). Размеры HMW пиков лекарственных форм FDRC Combo New и Combo 8 увеличились на 0,1% или менее, и размеры HMW пиков лекарственных форм FDRC Combo 4, Combo 5 и Combo 6 уменьшились примерно на 0,1% или менее после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5А).

#### Анализ методом cIEF.

cIEF выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственной форме DoE FDRC (3:1) Combo New, Combo 4, Combo 5, Combo 6 и Combo 8 после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размер кислотного пика контрольного ипилимумаба увеличился примерно на 5,59%, и размер кислотного пика контрольного ниволумаба DP уменьшился примерно на 0,05% после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC Combo New увеличились примерно на 0,64% и 5,98%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC Combo 4 увеличились примерно на 5,32% и 6,97%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC Combo 5 увеличились примерно на 0,12% и 5,34%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC Combo 6 увеличились примерно на 7,01% и 12,19%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC Combo 8 увеличились примерно на 7,17% после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 5В).

#### Пример 4.

Исследование осуществимости изобретения выполняли для оценки стабильности FDRC ипилимумаба/ниволумаба при различных соотношениях ипилимумаба к ниволумабу с использованием модифицированной версии лекарственной формы DoE FDRC (3:1) Combo New, охарактеризованной в примере 3, в качестве базовой лекарственной формы. Лекарственные формы на объединенной платформе (PC), содержащие FDRC ипилимумаба/ниволумаба, изготавливали в соотношениях ипилимумаба к ниволумабу 3:1, 1:3 и 1:1, как указано в табл. 5. Все лекарственные формы изготавливали в гистидиновом буфере и при конечных концентрациях 50 мкМ DTPA, 0,05% мас./об. PS80 и 8,0% мас./об. сахарозы (табл. 5). Прототип 4 PC FDRC ("PC: pH 5,5-1:3") имел соотношение 1:3 и pH 5,5; прототип 5 PC FDRC ("PC: pH 6,0-1:3") имел соотношение 1:3 и pH 6,0; прототип 6 PC FDRC ("PC: pH 6,5-1:3") имел соотношение 1:3 и pH 6,5; прототип 7 PC FDRC ("PC: pH 6,0-1:1") имел соотношение 1:1 и pH 6,0; и прототип 8 PC FDRC ("PC: pH 6,0-3:1") имел соотношение 3:1 и pH 6,0 (табл. 5).

Таблица 5

Лекарственные формы на объединенной платформе,  
содержащие FDRC ипилимумаба/ниволумаба

Прото- тип	Соотн.	Конечная конц. во флаконе: (мг/мл)		рН	Mannit	NaCl	DTPA	PS80	Sахароза
		Ипи	Ниво		% масса/ объем	мМ	мкМ	% масса/ объем	% масса/ объем
4	1:3	2,5	7,5	5,5	-	-	50	0,05	8,0
5	1:3	2,5	7,5	6,0	-	-	50	0,05	8,0
6	1:3	2,5	7,5	6,5	-	-	50	0,05	8,0
7	1:1	5	5	6,0	-	-	50	0,05	8,0
8	3:1	7,5	2,5	6,0	-	-	50	0,05	8,0

#### Анализ методом SEC.

SEC выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах на объединенной платформе (PC) FDRC PC: pH 6,0-1:1, PC: pH 5,5-1:3, PC: pH 6,0-1:3, PC: pH 6,5-1:3 и PC: pH 6,0-3:1 после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6А). Размеры HMW пиков лекарственных форм контрольных ниволумаба и ипилимумаба увеличились примерно на 1,7% и 0,25%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6А). Размер HMW пика лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:1 увеличился примерно на 0,5% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг.

6A). Размер HMW пика лекарственной формы FDRC PC: pH 5,5-1:3 увеличился примерно на 1,25% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6A). Размер HMW пика лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:3 увеличился примерно на 0,75% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6A). Размер HMW пика лекарственной формы FDRC PC: pH 6,5-1:3 увеличился примерно на 0,1% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6A). Размер HMW пика лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-3:1 увеличился примерно на 0,25% после хранения в течение 3 месяцев при 40°C (фиг. 6A).

Те же самые лекарственные формы анализировали методом SEC после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма контрольного ниволумаба имела исходный размер HMW пика около 0,70% на день 0, который увеличился до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,71% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма контрольного ипилимумаба имела исходный размер HMW пика около 0,4% на день 0, который не изменился после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма FDRC PC: pH 6,0-1:1 имела исходный размер HMW пика около 0,44% на день 0, который увеличился до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,45% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма FDRC PC: pH 5,5-1:3 имела исходный размер HMW пика около 0,47% на день 0, который увеличился до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,48% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма FDRC PC: pH 6,0-1:3 имела исходный размер HMW пика около 0,51% на день 0, который не изменился после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма FDRC PC: pH 6,5-1:3 имела исходный размер HMW пика около 0,56% на день 0, который увеличился до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,58% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B). Лекарственная форма FDRC PC: pH 6,0-3:1 имела исходный размер HMW пика около 0,37% на день 0, который увеличился до конечного размера HMW пика, составляющего около 0,39% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 6B).

#### Анализ методом cIEF.

cIEF выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах на комбинированной платформе (PC) FDRC PC: pH 6,0-1:1, PC: pH 5,5-1:3, PC: pH 6,0-1:3, PC: pH 6,5-1:3 и PC: pH 6,0-3:1 после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A) и 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B).

После хранения в течение 3 месяцев при 25°C размер кислотного пика контрольного ниволумаба уменьшился примерно на 0,05%, и размер кислотного пика контрольного ипилимумаба увеличился примерно на 5,59% (фиг. 7A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:1 увеличились примерно на 2,6% и 7%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 5,5-1:3 увеличились примерно на 2,1% и 5,9%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:3 увеличились примерно на 3,7% и 6,8%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,5-1:3 увеличились примерно на 5,9% и 6,3%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-3:1 увеличились примерно на 1,3% и 6,2%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 7A). Во всех лекарственных формах FDRC PC, хранящихся в течение 3 месяцев при 25°C, размер кислотного пика ипилимумаба увеличился примерно на 5,9-7,0%, или в среднем примерно на 2,0% за месяц (фиг. 7A). Размер кислотного пика ниволумаба лекарственной формы FDRC FC увеличился примерно на 1,3-5,9%, или максимально примерно на 2% за месяц (фиг. 7A).

После хранения в течение 3 месяцев при 5°C размер кислотного пика контрольного ниволумаба уменьшился примерно на 5,2%, и размер кислотного пика контрольного ипилимумаба уменьшился примерно на 1% (фиг. 7B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:1 уменьшились примерно на 2% и увеличились примерно на 2,2%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 5,5-1:3 уменьшились примерно на 1,1% и примерно на 0,3%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-1:3, каждого, уменьшились примерно на 0,2% после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,5-1:3 увеличились примерно на 0,5% и уменьшились примерно на 3,1%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы FDRC PC: pH 6,0-3:1 увеличились примерно на 0,1% и уменьшились примерно на 0,2%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 5°C (фиг. 7B). В сумме, размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба в лекарственных формах 1:3 в диапазоне pH 5,5-6,5 не показали существенного изменения после хранения в течение 3 месяцев при 5°C, и значимое изменение ипилимумаба и ниволумаба отсутствовало при 3 различных соотношениях (фиг. 7B).

#### Пример 5.

Анализ осуществимости изобретения выполняли для оценки стабильности FDRC (1:1) ипилимумаба/ниволумаба в нескольких лекарственных формах на основе DP ниволумаба, как указано в табл. 6. Эти

лекарственные формы были разработаны путем модификации лекарственной формы на основе DP ниволумаба (фиг. 1). В общей сложности 24 флакона с DP имилимумабом и DP ниволумабом подвергали замене буфера, содержащегося в исходных лекарственных формах на основе DP, на буферные композиции, содержащие 20 mM лимонной кислоты и 50 mM NaCl при pH 6,0 (прототип А), используя центрифужные фильтры с порогом отсечения по молекулярной массе 50 кДа. Прототипы В-Д получали таким же способом для получения характеристик, указанных в табл. 6. Прототип А содержал 7,5 mg/ml ипилимумаба, 7,5 mg/ml ниволумаба, 20 mM цитрата, 50 mM NaCl, 3,0% мас./об. маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты (DTPA) и 0,02% PS80 при pH 6,0. Прототип А был идентичным DP ниволумабу, за исключением того, что прототип А содержал 100 мкМ пентетовой кислоты, тогда как DP ниволумаб содержал 20 мкМ пентетовой кислоты. Прототип В содержал 7,5 mg/ml ипилимумаба, 7,5 mg/ml ниволумаба, 20 mM цитрата, 50 mM NaCl, 3,0% мас./об. маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты (DTPA) и 0,02% PS80 при pH 6,5. Прототип С содержал 7,5 mg/ml ипилимумаба, 7,5 mg/ml ниволумаба, 20 mM цитрата, 100 mM NaCl, 1,0% мас./об. маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты (DTPA) и 0,02% PS80 при pH 6,5. Прототип Д содержал 7,5 mg/ml ипилимумаба, 7,5 mg/ml ниволумаба, 20 mM цитрата, 50 mM NaCl, 6% мас./об. сахарозы, 100 мкМ пентетовой кислоты (DTPA) и 0,02% PS80 при pH 6,0.

Таблица 6

## Лекарственные формы, содержащие FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба

Прототип А:	Ипи/Ниво: 7,5 + 7,5 в Цитрате (20 mM), pH 6,0, 50 mM NaCl, 3,0% масса/объем маннита, <b>100 мкМ пентетовой кислоты, 0,02% PS80</b>
Прототип В:	Ипи/Ниво: 7,5 + 7,5 в Цитрате (20 mM), <b>pH 6,5, 50 mM NaCl, 3,0% масса/объем маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты, 0,02% PS80</b>
Прототип С:	Ипи/Ниво: 7,5 + 7,5 в Цитрате (20 mM), <b>pH 6,5, 100 mM NaCl, 1,0% масса/объем маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты, 0,02% PS80</b>
Прототип D:	Ипи/Ниво: 7,5 + 7,5 в Цитрате (20 mM), pH 6,0, 50 mM NaCl, <b>6% масса/объем сахарозы, 100 мкМ пентетовой кислоты, 0,02% PS80</b>

\* Примечание: прототип А является схожим с лекарственной формой на основе DP ниволумаба, за исключением того, что концентрация пентетовой кислоты (DTPA) является такой же, как в лекарственной форме на основе DP ипилимумаба (смотри фиг. 1).

Прототипы А, В, С и D FDRC фильтровали через фильтр 0,2 мкм и заполняли в 10 cc флаконы SCHOTT® (1 или 2 мл на флакон), закрывали и герметизировали. Затем их помещали в стабильные условия на период до 12 месяцев до анализа стабильности по внешнему виду, измерения pH, методом SEC, HIAc и cIEF.

## Анализ методом SEC.

SEC выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и прототипах А, В, С и D FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Размеры HMW пиков контрольных лекарственных форм ниволумаба и ипилимумаба увеличились примерно на 0,38% и 0,02%, соответственно, после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Размер HMW пика лекарственной формы прототипа А FDRC увеличился примерно на 0,36% после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Размер HMW пика лекарственной формы прототипа В FDRC увеличился примерно на 0,41% после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Размер HMW пика лекарственной формы прототипа С FDRC увеличился примерно на 0,37% после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Размер HMW пика лекарственной формы прототипа D FDRC увеличился примерно на 0,24% после хранения в течение 1 месяца при 40°C (фиг. 8). Лекарственная форма контрольного ниволумаба и лекарственные формы прототипов А и В FDRC, каждая, содержали 3% мас./об. маннита, тогда как лекарственная форма контрольного ипилимумаба и лекарственная форма прототипа С FDRC содержала 1% маннита, и лекарственная форма прототипа D FDRC не содержала маннит (смотри табл. 6).

## Анализ методом cIEF.

cIEF выполняли на контроле DP ниволумабе, контроле DP ипилимумабе и лекарственных формах прототипов А, В, С и D FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Размер кислотного пика ниволумаба увеличился примерно на 7,5%, и размер кислотного пика ипилимумаба увеличился примерно на 8,8% после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы прототипа А FDRC, каждого, увеличились примерно на 9,4% после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы прототипа В FDRC увеличились примерно на 8,2% и 13,8%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы прототипа С FDRC увеличились примерно на 8,7% и 10,2%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Размеры кислотных пиков ниволумаба и ипилимумаба лекарственной формы прототипа D FDRC увеличи-

лись примерно на 10,1% и 9%, соответственно, после хранения в течение 3 месяцев при 25°C (фиг. 9). Эффект NaCl на изменение кислотного пика можно наблюдать при сравнении лекарственной формы контрольного ипилимумаба и лекарственной формы прототипа С FDRC, каждая из которых содержала 100 мМ NaCl, с лекарственной формой контрольного ниволумаба и лекарственными формами прототипов А, В и D FDRC, каждая из которых содержала 50 мМ NaCl (фиг. 9; табл. 6).

#### Пример 6.

Лекарственный препарат, содержащий комбинацию с фиксированным соотношением доз (FDRC) ниволумаба и ипилимумаба, изготавливали в соотношении 1:3. Комбинацию, содержащую FDRC ипилимумаба/ниволумаба, изготавливали из коммерческих фармацевтических субстанций ипилимумаба и ниволумаба; смотри фиг. 1. Фармацевтическая субстанция ипилимумаба представляет собой водный раствор, содержащий 5 мг/мл ипилимумаба в 20 мМ Трис-гидрохлорида, 100 мМ хлорида натрия, 1,0% мас./об. маннита, 100 мкМ пентетовой кислоты, 0,01% мас./об. полисорбата 80 при pH 7,0. Фармацевтическая субстанция ниволумаба представляет собой водный раствор, содержащий 20 мг/мл ниволумаба в 20 мМ цитрата натрия, 50 мМ хлорида натрия, 3,0% мас./об. маннита, 20 мкМ пентетовой кислоты, 0,04% мас./об. полисорбата 80 при pH 6,0. Обе фармацевтические субстанции ипилимумаба и ниволумаба хранили при температуре 2°C-8°C.

Лекарственный препарат, содержащий комбинацию FDRC (3:1) ниволумаба и ипилимумаба, изготавливали путем объединения фармацевтических субстанций ипилимумаба и ниволумаба в белковом соотношении ипилимумаба к ниволумабу 3:1. Данные по изменению стабильности в течение до 6 месяцев показали, что лекарственный препарат, содержащий FDRC, был стабильным при хранении при температуре от 2°C до 8°C, предполагаемом условии хранения. Лекарственный препарат, содержащий FDRC, представляет собой стерильный, апирогенный, одноразовый, не содержащий консервантов, изотонический водный раствор, предназначенный для внутривенного (IV) введения. Лекарственный препарат, содержащий FDRC, можно вводить в неразбавленном виде при общей концентрации белка 6,2 мг/мл или дополнительно разбавлять 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций, USP или 5% раствором декстрозы для инъекций, USP до желаемых концентраций. Лекарственный препарат, содержащий FDRC, упакован во флакон из бесцветного нейтрального стекла типа I или литой флакон и закрыт бутылкаучуковой пробкой, покрытой пленкой FluroTec®. Композиция FDRC представлена в табл. 7.

Таблица 7

Сравнение композиций лекарственных препаратов, содержащих FDRC, ипилимумаба и ниволумаба

Компонент	Функция	Количество (Концентрация)			
		FDRC	Ипилимумаб	Ниволумаб	Ед.изм.
Ипилимумаб (BMS-734016)	Активный ингредиент	4,62	5	-	мг/мл
Ниволумаб (BMS-936558)	Активный ингредиент	1,54	-	10	мг/мл
Трис-гидрохлорид	Буферный агент	18,5	20	-	мМ
Цитрат натрия, дигидрат	Буферный агент	1,5	-	20	мМ
Хлорид натрия	Модификатор тоничности	96,2	100	50	мМ
Маннит	Модификатор тоничности	1,2	1,0	3,0	% (масса/объем)
Пентетовая кислота <sup>1</sup>	Хелатор ионов металлов	93,9	100,0	20,0	мкМ
Полисорбат 80	Поверхностно-активное вещество	0,012	0,010	0,020	% (масса/объем)
pH при 20 °C – 25 °C <sup>2</sup>	Регулировка pH	6,0	7,0 (при 4 °C)	6,0	Единицы pH
Вода для инъекции	Растворитель			q.s.	

<sup>1</sup>Также известная как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA).

<sup>2</sup>Разбавленные растворы соляной кислоты и гидроксида натрия могут быть использованы для регулирования pH во время изготовления DS ипилимумаба и ниволумаба. pH раствора не регулируется во время изготовления DP.

Стабильность образцов DP FDRC, изготовленных, как показано в табл. 7, оценивали в предполагаемых (5°C), ускоренных (25°C) и стрессовых (40°C) условиях хранения.

Основные пути деградации ипилимумаба и ниволумаба идентифицировали как агрегацию (HMW фракции детектировали методом SE-HPLC), фрагментацию (LMW фракции детектировали методом SE-HPLC) и дезамидирование (варианты, отличающиеся кислотным зарядом, детектировали методом CEX или iCIEF), как показано в примерах 1-5. Эти изменения оценивали методами SE-HPLC и iCIEF в исследовании изменения стабильности FDRC. Кроме того, механические включения и активности связывания оценивали с помощью HIAC и анализа связывания ELISA, соответственно, в этих исследованиях в заданные моменты времени.

Результаты, полученные в результате исследований, показали, что в DP FDRC уровни содержания объединенных HMW фракций, объединенных LMW фракций, варианты с кислотным зарядом ниволумаба, варианты с кислотным зарядом ипилимумаба, и механические включения оставались в основном без изменений через 6 месяцев после хранения при температуре от 2°C до 8°C.

Исследования, проведенные через 6 месяцев хранения в ускоренных условиях при 25°C, показали, что скорость образования HMW фракций сопоставима между DP FDRC, DP ниволумабом и DP ипилимумабом. Скорость образования LMW фракций в DP FDRC составила 0,15% в месяц, которая сопоставима со скоростью образования LMW фракций в DP ипилимумабе, составляющей 0,18% в месяц, так как FDRC преимущественно состоит из ипилимумаба. Скорость образования кислотных вариантов ниволумаба в DP FDRC составила 1,98% в месяц, которая сопоставима со скоростью образования кислотных вариантов в DP ниволумабе, составляющей 1,76% в месяц. Скорость образования кислотных вариантов ипилимумаба в FDRC и DP ипилимумабе считается сопоставимой при 2,4% и 1,9% в месяц, соответственно. Уровень механических включений оставался в основном без изменений.

Исследования, проведенные через 3 месяца хранения при 40°C, показали, что аналогичные, но более значительные изменения наблюдались в DP FDRC в этих условиях.

Данные, полученные в результате исследования в период применения "use-time study", продемонстрировали стабильность, совместимость и эквивалентность дозируемых растворов, изготовленных из DP FDRC, и индивидуальных DP ниволумаба и ипилимумаба, объединенных в пакетах для внутривенного вливания.

Таким образом, сопоставимые скорости образования критических показателей качества (CQA), таких как HMW фракции, LMW фракции и кислотные варианты, в стрессовых и ускоренных условиях, а также незначительные изменения этих CQA в рекомендуемых условиях хранения указывают на потенциальную возможность разработки DP FDRC с коммерциализованными DS ниволумаба и ипилимумаба. Каждое из вышеуказанных исследований описано более подробно ниже.

Агрегация и фрагментация, детектированные методом SE-HPLC.

Степень агрегации (HMW фракции) и фрагментации (LMW фракции) FDRC оценивали методом SE-HPLC. HMW фракции, мономер и LMW фракции ипилимумаба совместно элюировали с HMW фракциями, мономером и LMW фракциями ниволумаба, соответственно. Результаты, указанные в табл. 8, представлены в виде процента от площади объединенного мономера, объединенных HMW фракций и объединенных LMW фракций ипилимумаба и ниволумаба. Уровень содержания объединенных HMW фракций по данным испытания составил 0,5% на исходном уровне и оставался в основном без изменений через 6 месяцев хранения при 5°C и 25°C (изменение составило от 0,5% до 0,6%), и увеличился до 1,0% через 3 месяца хранения при 40°C. Уровень содержания объединенных LMW фракций по данным испытания составил 0,1% на исходном уровне и оставался в основном без изменений через 6 месяцев хранения при 5°C (изменение составило от 0,1% до 0,2%), увеличился до 1,0% через 6 месяцев хранения при 25°C, и увеличился до 2,4% через 3 месяца хранения при 40°C.

Таблица 8

Объединенный мономер, HMW фракции и LMW фракции в FDRC, детектированные методом SE-HPLC

Время (Мес)	Объединенный мономер (%)			Объединенные HMW фракции (%)			Объединенные LMW фракции (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Исх.	99,3	99,3	99,3	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1
1	NT	99,3	98,9	NT	0,6	0,6	NT	0,2	0,4
2	99,3	99,2	97,5	0,5	0,5	0,8	0,2	0,3	1,7
3	99,3	98,8	96,7	0,5	0,6	1,0	0,2	0,6	2,4
6	99,3	98,4	NT	0,6	0,7	NT	0,2	1,0	NT

NT=не тестировали.

Эти результаты сравнивали с коммерческими лекарственными формами контрольных DP ипилимумаба (5 мг/мл) и ниволумаба (10 мг/мл), помещенными на хранение при 5°C, 25°C и 40°C, а также DP

FDRC, анализируемым аналогичным способом с помощью этого модифицированного метода SEC-HPLC, как показано в табл. 9 и 10, соответственно. На основании имеющихся данных очевидно, что ипилимумаб, ниволумаб и FDRC не имеют тенденции к образованию HMW фракций при рекомендуемой температуре хранения 2-8°C, и скорость образования HMW фракций в месяц сопоставима между ипилимумабом, ниволумабом и FDRC при 25°C и 40°C, как показано в табл. 11. Более важным является то, что скорости образования HMW и LMW фракций в FDRC эквивалентны скоростям образования HMW и LMW фракций в ипилимумабе, так как FDRC преимущественно состоит из ипилимумаба, и общая белковая концентрация в FDRC, то есть 6,2 мг/мл, является близкой к концентрации DP ипилимумаба, составляющей 5 мг/мл. Сопоставимые скорости образования CQA, таких как HMW и LMW фракции, в стрессовых и ускоренных условиях, а также незначительное изменение этих CQA в рекомендуемых условиях хранения указывает на потенциал для разработки DP FDRC.

Таблица 9

Мономер, HMW фракции и LMW фракции в ипилимумабе, детектированные методом SE-HPLC

Время (Месяц)	Мономер (%)			HMW фракции (%)			LMW фракции (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Исх.	99,38	99,38	99,38	0,4	0,4	0,4	0,22	0,22	0,22
1	99,37	99,33	98,98	0,4	0,38	0,42	0,23	0,29	0,6
2	99,39	99,26	98,54	0,39	0,395	0,51	0,22	0,325	0,955
3	99,37	99,16	96,65	0,4	0,43	0,635	0,23	0,415	2,54
6	99,29	98,62	NT	0,475	0,535	NT	0,245	1,32	NT

Таблица 10

Мономер, HMW фракции и LMW фракции в ниволумабе, детектированные методом SE-HPLC

Время (Месяц)	Мономер (%)			HMW фракции (%)			LMW фракции (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Исх.	98,99	98,99	98,99	0,705	0,705	0,705	0,315	0,315	0,315
1	98,98	98,94	98,35	0,705	0,73	1,115	0,32	0,33	0,55
2	98,98	98,91	97,56	0,705	0,76	1,595	0,305	0,34	0,81
3	98,98	98,79	96,45	0,715	0,815	2,37	0,31	0,395	1,18
6	98,91	98,14	NT	0,795	0,965	NT	0,3	0,425	NT

Таблица 11

Скорость образования/месяц мономера, HMW фракций и LMW фракций  
в ипилимумабе, ниволумабе и FDRC, детектированная методом SE-HPLC

Время (Месяц)	Мономер (%)			HMW фракции (%)			LMW фракции (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
FDRC	0,00	0,16	0,92	0,02	0,03	0,17	0,02	0,15	0,82
Ипилимумаб	0,01	0,13	0,86	0,01	0,02	0,08	0,00	0,18	0,73
Ниволумаб	0,01	0,14	0,84	0,02	0,04	0,55	0,00	0,02	0,29

Варианты, отличающиеся зарядами, детектированные методом iCIEF. Профиль вариантов зарядов FDRC определяли с помощью анализа методом iCIEF. Хроматографический профиль содержал разделенные пики ипилимумаба и ниволумаба. Относительные величины площадей кислотных пиков, площадей главных пиков и площадей основных пиков ипилимумаба представлены в табл. 12, и относительные величины площадей кислотных пиков, площадей главных пиков и площадей основных пиков ниволумаба представлены в табл. 13. Площади кислотных, главных и основных пиков ипилимумаба и ниволумаба оставались в основном без изменений через 6 месяцев хранения при 5°C. Изменения в профиле зарядов наблюдались при 25°C и 40°C для ипилимумаба и ниволумаба. Деградация была значительной при 40°C в небольшом временном интервале и поэтому не использовалась для сравнения и считалась слишком агрессивной для оценки стабильности DP.

Таблица 12

Профиль зарядов ипилимумаба в FDRC, детектированный методом iCIEF

Время (Месяц)	Кислотные пики (%)			Главный пик (%)			Основные пики (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Исх.	34,6	34,6	34,6	59,5	59,5	59,5	5,9	5,9	5,9
1	NT	37,2	48,7	NT	56,7	45,2	NT	6,2	6,1
2	34,5	39,6	61,2	57,9	54,5	33,7	7,6	5,9	5,1
3	34,6	42,4	68,3	59,2	51,9	27,4	6,2	5,7	4,3
6	35,6	49,0	NT	59,0	45,9	NT	5,4	5,1	NT

Таблица 13

Профиль зарядов ниволумаба в FDRC, детектированный методом iCIEF

Время (Месяц)	Кислотные пики (%)			Главный пик (%)			Основные пики (%)		
	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C	5 °C	25 °C	40 °C
Исх.	33,7	33,7	33,7	59,8	59,8	59,8	6,5	6,5	6,5
1	NT	34,3	45,0	NT	59,8	46,3	NT	5,9	8,7
2	34,8	39,1	61,3	59,3	54,5	31,2	5,9	6,5	7,5
3	33,6	37,7	65,9	60,6	55,2	27,9	5,9	7,1	6,2
6	33,7	45,5	NT	59,3	46,4	NT	7,1	8,1	NT

Кроме того, как обсуждалось ранее, композиция FDRC, оценённая выше, состоит из трис.HCl и дигидрата цитрата натрия и поэтому имеет тенденцию к изменению pH при изменении температуры, обусловленному аминовым буфером Трис-HCl. Поэтому изменения профиля зарядов между FDRC и ниволумабом происходили при 25°C в соответствии с температурой изготовления образцов и температурой хранения.

Сравнение профиля кислотного заряда ипилимумаба в FDRC, представленное в табл. 12, против контрольного DP ипилимумаба в Трис-HCl буфере (комерческая композиция) при pH 7 (4°C) при 25°C (табл. 14) показало, что образование кислотного пика сопоставимо при 2,4% и 1,93% в месяц, соответственно, как показано на фиг. 10. Это относительно незначительное различие в стрессовых условиях считается незначительным для стабильности лекарственного препарата, содержащего FDRC, в рекомендуемых условиях хранения (2°C-8°C), как видно в табл. 12.

Исторически изменения в профиле зарядов ипилимумаба оценивали методом СЕХ и, таким образом, данные собирали для выявления сопоставимости профиля зарядов в различных условиях для ипилимумаба, однако вероятность дезамидирирования, основного пути деградации ипилимумаба, является потенциально низкой, поскольку кинетика дезамидирирования обычно более медленная при более низком pH.

Таблица 14

Профиль зарядов ипилимумаба, полученный методом iCIEF при 25°C

Время (Месяц)	Кислотные пики (%)	Главный пик (%)	Основные пики (%)
	Лабораторная партия для проверки стабильности	Лабораторная партия для проверки стабильности	Лабораторная партия для проверки стабильности
Исх.	39,71	56,59	3,69
1	42,34	54,84	2,82
3	45,3	51,2	3,5
6	51,6	45	3,4

Сравнение профиля кислотного заряда ниволумаба в FDRC, показанного в табл. 15 против трех партий ниволумаба с долгосрочной стабильностью (LTSB) при 25°C указывает на то, что образование кислотного пика является сопоставимым при 1,97% и 1,75% в месяц, соответственно, как показано на фиг. 11.

Таблица 15

Профиль заряда ниволумаба (в партиях GMP), полученный методом iCIEF при 25°C

Время (Месяц)	Кислотные пики (%)			Главный пик (%)			Основные пики (%)		
	Партия 2J71008	Партия 2J71191	Партия 2J71192	Партия 2J71008	Партия 2J71191	Партия 2J71192	Партия 2J71008	Партия 2J71191	Партия 2J71192
Исх.	36,1	36,3	35,2	58,1	56,6	58,8	5,8	7,1	6,0
1	33,0	29,6	36,2	61,8	62,9	57,2	5,2	7,5	6,6
3	40,8	39,3	37,2	52,9	52,4	55,6	6,3	8,3	7,2
6	45,7	44,1	44,3	46,4	47,2	47,8	7,9	8,7	7,9

Механические включения, детектированные методом НИАС.

Образцы, хранящиеся при 5°C и 25°C в течение периода, составляющего до 6 месяцев, исследовали с использованием процедуры подсчета твердых частиц методом затенения (НИАС) для определения размера и количества частиц в соответствии с размером в DP FDRC. Как показано в табл. 16, количество механических включений для размеров ≥2 мкм, ≥5 мкм, ≥10 мкм и ≥25 мкм колебалось, но находилось в пределах критерия приемлемости, указанного в USP <787>.

Таблица 16

Механические включения по данным НИАС

	Механические включения (частиц/мл)			
	≥ 2 мкм	≥ 5 мкм	≥ 10 мкм	≥ 25 мкм
Исходное	161	21	5	0
Через 6 месяцев при 5 °C	134	43	13	2
Через 6 месяцев при 25 °C	174	34	6	1

Активность связывания, определенная с помощью анализов ELISA. Анализы ELISA использовали для исследования специфического связывания ипилимумаба с рецептором CTLA-4 человека и специфического связывания ниволумаба с рецептором PD-1 человека. Активности связывания ипилимумаба и ниволумаба в образцах FDRC рассчитывали относительно референсных стандартов ипилимумаба и ниволумаба, соответственно. Активности связывания образцов FDRC через 2 месяца хранения при 25°C находились в пределах предлагаемого критерия приемлемости (70-130%) (табл. 17).

Таблица 17

Активности связывания, определенные с помощью анализов ELISA

Условие хранения	Активность связывания ипилимумаба относительно референсного стандарта ипилимумаба (%)	Активность связывания ниволумаба относительно референсного стандарта ниволумаба (%)
Исходное	87	119
Через 2 месяца хранения при 25 °C	87	78

Анализ методом картирования триптических пептидов.

Анализ методом картирования триптических пептидов выполняли для измерения дезамидирования и окисления. Образцы восстанавливали, алкилировали и расщепляли трипсином. Триптические пептиды разделяли на колонке C-18 и детектировали с помощью УФ-детектора при 215 нм и 280 нм с последующим масс-спектрометром (LTQ-Orbitrap-Elite). Сравнительный количественный анализ выполняли путем сравнения площадей пиков интактных пептидов, а также модифицированных пептидов на выбранных ионных хроматограммах. Результаты анализа показаны в табл. 18 и 19.

Таблица 18

## Картирование триптических пептидов - дезамидирование

Условие хранения	Ниво H <sub>4</sub> <sup>3</sup> (%)	Ипи H <sub>5</sub> <sup>4</sup> (%)	Ипи H37/Ниво H36 Deam1 <sup>5</sup> (%)	Ипи H37/Ниво H36 Deam2 <sup>6</sup> (%)	Ипи H37/Ниво H36 Deam3 <sup>7</sup> (%)	Ипи H37/Ниво H36 Deam4 <sup>8</sup> (%)
Исходное	0,5	2,8	3,4	3,2	1,4	3,6
Через 2 месяца хранения при 25 °C	0,7	4,6	4,7	4,6	1,5	3,7
Через 6 месяцев хранения при 25 °C	1,0	3,9	5,2	5,9	0,7	2,5

Таблица 19

## Картирование триптических пептидов - окисление

Условие хранения	Ипи H <sub>21</sub> /Ниво H <sub>22</sub> <sup>9</sup> (%)	Ниво H <sub>4</sub> <sup>10</sup> (%)	Ипи H <sub>3</sub> <sup>11</sup> (%)
Исходное	4,4	0,2	0,5
Через 2 месяца хранения при 25°C	4,9	0,6	0,5
Через 6 месяцев хранения при 25°C	3,3	0,3	0,2

Анализ pH образцов.

Измеряли pH DP FDCR, как показано в табл. 20.

Таблица 20

## Значения pH растворов DP

Условия хранения	25 °C	5 °C
исходное	6,58	6,58
2 месяца	6,59	6,56
6 месяцев	6,44	6,38

<sup>3</sup>Ниво H<sub>4</sub>=Триптический пептид тяжелой цепи # 4 для ниволумаба.<sup>4</sup>Ипи H<sub>5</sub>=Триптический пептид тяжелой цепи # 5 для ипилимумаба.<sup>5</sup>Ипи H<sub>37</sub>/Ниво H<sub>36</sub> Deam1=Триптический пептид тяжелой цепи # 37 для ипилимумаба (Asn #) и #36 для ниволумаба (Asn#).<sup>6</sup>Ипи H<sub>37</sub>/Ниво H<sub>36</sub> Deam2=Триптический пептид тяжелой цепи # 37 для ипилимумаба (Asn #) и #36 для ниволумаба (Asn#).<sup>7</sup>Ипи H<sub>37</sub>/Ниво H<sub>36</sub> Deam3=Триптический пептид тяжелой цепи # 37 для ипилимумаба (Asn #) и #36 для ниволумаба (Asn#).<sup>8</sup>Ипи H<sub>37</sub>/Ниво H<sub>36</sub> Deam4=Триптический пептид тяжелой цепи # 37 для ипилимумаба (Asn #) и #36 для ниволумаба (Asn#).<sup>9</sup>Ипи H<sub>21</sub>/Ниво H<sub>22</sub>=Триптический пептид тяжелой цепи #21 для ипилимумаба (His/Met # ) и #22 для ниволумаба (His/Met #).<sup>10</sup>Ниво H<sub>4</sub>=Триптический пептид тяжелой цепи # 4 для ниволумаба.<sup>11</sup>Ипи H<sub>3</sub>=Триптический пептид тяжелой цепи # 3 для ипилимумаба.

Стабильность в период применения "Use-Time Stability" лекарственного препарата FDRC.

Исследование выполняли для демонстрации стабильности и совместимости DP FDRС с 0,9% раствором хлорида натрия, USP (NS), пакетами для внутривенного (IV) вливания, наборами для внутривенного вливания и встроенным фильтром. Через 2 месяца хранения при 5°C образцы DP FDRС разбавляли в NS в пакете для внутривенного вливания, который хранили при 25°C в течение 4 ч с последующими 20 ч при 5°C. Затем проводили инфузию раствора в пакете для внутривенного вливания с помощью набора для внутривенного вливания и встроенным фильтром. Образцы собирали и анализировали методом HIAС, визуализации микрокровотока Micro Flow Imaging (MFI), SE-HPLC, CE-SDS, iCIEF и обращенно-фазовой ультравысокоеффективной жидкостной хроматографии (RP-UPLC).

Результаты исследования представлены в табл. 21-23. Данные показали незначительное или отсутствие изменения от исходных значений для механических включений (по данным HIAС), агрегации (по данным SE-HPLC), фрагментации (по данным SE-HPLC), чистоты (по данным CE-SDS), профиля зарядов (по данным iCIEF) и белкового соотношения ипилимумаб/ниволумаб (по данным RP-UPLC) после завершения исследования совместимости.

Результаты указывают на то, что DP FDRC можно разбавлять 0,9% раствором хлорида натрия, USP до концентрации в диапазоне 1,5/0,5-4,2/1,4 мг/мл ипилимумаба/ниволумаба для внутривенного вливания. Разбавленный раствор в пакете для внутривенного вливания можно хранить при 5°C в течение до 24 ч и в течение 4 ч из 24 ч при комнатной температуре (25°C).

Таблица 21

Стабильность в период применения и сопоставимость лекарственного препарата FDRC

Условия	HIAC (частиц/мл)				MFI (частиц/мл)			SE-HPL			CE-SDS (в восст. усл.)
	≥2 МКМ	≥5 МКМ	≥10 МКМ	≥25 МКМ	2-10 МКМ	≥10 МКМ	≥25 МКМ	HMW (%)	Мономер (%)	LMW (%)	Чистота (%)
1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб											
Исходные <sup>12</sup>	138	26	5	0	353	11,5	0	0,4	99,4	0,3	99,6
Через 24 часа <sup>13</sup>	213	52	14	0	414	18	1,6	0,3	99,3	0,4	99,6
4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб											
Исходные	345	77	24	1	888	6,5	0	0,4	99,3	0,3	99,6
Через 24 часа	193	36	12	1	455	0	0	0,4	99,3	0,3	99,6

Таблица 22

Стабильность в период применения и сопоставимость лекарственного препарата FDRC

Условия	iCIEF-Ипилимумаб			iCIEF-Ниволумаб			RP-UPLC
	Кислотн. пики (%)	Главн. пик (%)	Основн. пики (%)	Кислотн. пики (%)	Главн. пик (%)	Основн. пики (%)	Ипилимумаб/ Ниволумаб Белковое соотн.
1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб							
Исходн.	38,9	56,2	4,9	34,3	57,5	8,3	2,8
24 часа	38,0	56,8	5,1	34,2	57,7	8,1	2,8
4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб							
Исходн.	37,2	58,1	4,7	34,2	58,0	7,8	2,9
24 часа	37,9	57,2	4,9	34,8	57,9	7,3	2,8

Таблица 23

Стабильность в период применения и сопоставимость лекарственного препарата FDRC

Условия	A280 (Традиционный)		A280 (Solo-VPE)	pH
1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб				
Исходные	2,07		1,998	6,36
Через 24 часа	1,924		2,012	6,33
4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб				
Исходные	5,618		5,615	6,38
Через 24 часа	5,529		5,647	6,37

<sup>12</sup>Образцы, взятые из пакета для внутривенного вливания в нулевой момент времени после разбавления DP FDRC в пакете для внутривенного вливания.

<sup>13</sup>Образцы, взятые после 24-часового хранения и вливания с помощью набора для внутривенного вливания и встроенного фильтра.

Стабильность в период применения "Use-Time Stability" вводимого совместно лекарственного препарата ипилимумаба и ниволумаба.

Исследование выполняли для демонстрации стабильности и совместимости вводимого совместно DP с 0,9% раствором хлорида натрия, USP (NS), пакетами для внутривенного вливания, наборами для

внутривенного вливания и встроенным фильтрами. Флаконы, содержащие монотерапевтические DP ипилимумаб и ниволумаб, разбавляли в NS в пакете для внутривенного вливания, который хранили при 25°C в течение 4 ч с последующими 20 ч при 5°C. Затем проводили инфузию раствора, содержащегося в пакете для внутривенного вливания, с помощью набора для внутривенного вливания и встроенного фильтра. Образцы собирали и анализировали с помощью НИАС, визуализации микрокровотока (MFI), SE-HPLC, CE-SDS, iCIEF обращенно-фазовой ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-UPLC).

Результаты исследования представлены в табл. 24-26. Данные показывают незначительное или отсутствие изменения от исходных значений для механических включений (с помощью НИАС), агрегации (с помощью SE-HPLC), фрагментации (с помощью SE-HPLC), чистоты (с помощью CE-SDS), профиля вариантов зарядов (с помощью iCIEF) и белкового соотношения ипилимумаб/ниволумаб (с помощью RP-UPLC) после завершения исследования совместимости. Результаты указывают на то, что вводимый совместно DP можно разбавлять 0,9% раствором хлорида натрия, USP до концентрации в диапазоне 1,5/0,5-4,2/1,4 мг/мл ипилимумаба/ниволумаба для внутривенного вливания. Разбавленный раствор в пакете для внутривенного вливания можно хранить при 5°C в течение до 24 ч и в течение до 4 ч из 24 ч при комнатной температуре (25°C).

Таблица 24

Стабильность в период применения "Use-Time Stability" и сопоставимость  
вводимого совместно лекарственного препарата имилимумаба и ниволумаба

Условия	НИАС (частиц/мл)				MFI (частиц/мл)			SE-HPLC			CE- SDS (в восст. усл.)
	≥2 мкм	≥5 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм	2-10 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм	HMW (%)	Моно- мер (%)	LMW (%)	
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты Non-DEHP Intravia)</b>											
Исходн. <sup>14</sup>	327	75	10	0	1078	8	1	0,3	99,4	0,2	99,6
Через 24 часа <sup>15</sup>	49	9	1	0	152	3	1	0,3	99,4	0,3	99,6
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты DEHP Viaflex)</b>											
Исходн.	373	54	8	0	1233	2	0	0,4	99,3	0,3	99,6
Через 24 часа	35	5	1	0	71	5	1	0,4	99,4	0,3	99,6
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты Non-DEHP Intravia)</b>											
Исходн.	862	170	17	0	2979	8	1	0,4	99,3	0,3	99,6
Через 24 часа	112	21	3	0	237	8	0	0,4	99,4	0,3	99,6
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты DEHP Viaflex)</b>											
Исходн.	431	91	15	0	1400	11	1	0,4	99,4	0,3	99,6
Через 24 часа	53	11	4	0	150	3	1	0,4	99,4	0,3	99,6

Таблица 25

Стабильность в период применения "Use-Time Stability" и сопоставимость вводимого совместно лекарственного препарата ипилимумаба и ниволумаба (продолжение 2)

Условия	iCIEF-Ипилимумаб			iCIEF-Ниволумаб			RP-UPLC Ипилимумаб/ Ниволумаб Белк. соотн.
	Кислотные пики (%)	Главный пик (%)	Осн. пики (%)	Кислотн. пики (%)	Главн. пик (%)	Осн. пики (%)	
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты Non-DEHP Intravia)</b>							
Исх.	36,3	59,9	3,8	35,9	59,1	5,0	2,85
Через 24 часа	36,2	59,9	3,9	33,8	60,7	5,5	2,80
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты DEHP Viaflex)</b>							
Исх.	36,8	59,8	3,4	35,2	58,6	6,2	2,87
Через 24 часа	36,2	60,1	3,7	35,3	58,3	6,4	2,79
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты Non-DEHP Intravia)</b>							
Исх.	36,6	59,8	3,6	34,1	59,8	6,1	2,9
Через 24 часа	36,9	59,5	3,6	33,6	60,4	6,0	2,87
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты DEHP Viaflex)</b>							
Исх.	36,3	59,9	3,8	36,0	57,3	6,7	2,93
Через 24 часа	36,7	59,5	3,8	35,2	58,6	6,2	2,92

Таблица 26

Стабильность в период применения "Use-Time Stability" и сопоставимость вводимого совместно лекарственного препарата ипилимумаба и ниволумаба (продолжение 3)

Условия	A280	A280 (Solo-VPE)	pH
	(Традиционный)		
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (пакеты Non-DEHP Intravia)</b>			
Исх.	1,994	1,941	6,21
Через 24 часа	1,898	1,936	6,19
<b>1,5/0,5 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (DEHP Viaflex bags)</b>			
Исх.	2,019	1,982	6,2
Через 24 часа	1,879	1,986	6,2
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (Non-DEHP Intravia bags)</b>			
Исх.	5,701	5,481	6,26
Через 24 часа	5,338	5,538	6,24
<b>4,2/1,4 мг/мл ипилимумаб/ниволумаб (DEHP Viaflex bags)</b>			
Исх.	5,586	5,509	6,26
Через 24 часа	5,363	5,499	6,26

<sup>14</sup>Образцы, собранные из пакетов для внутривенного вливания в нулевой момент времени после разбавления вводимого совместно DP в пакете для внутривенного вливания.

<sup>15</sup>Образцы, собранные через 24 ч хранения и инфузии с помощью набора для внутривенного вливания и встроенного фильтра.

#### Пример 7.

На этапе квалификации эксплуатации (Process Performance Qualification, PPQ) определяли предельные значения для pH и полисорбата 80 для комбинации с фиксированным соотношением доз 1:3 (FDRC) ниволумаба-ипилимумаба. Количественные составы лекарственного препарата, содержащего FDRC, представлены в табл. 27.

Таблица 27  
Количественные составы лекарственного препарата, содержащего FDRC

Компонент	Функция	Композиция	Количество (мг) на флакон (Ниволумаб/ ипилимумаб)	
			30/90	40/120
Ниволумаб (BMS-936558)	Активный ингредиент	1,54 мг/мл	31,11	41,58
Ипилимумаб (BMS-734016)	Активный ингредиент	4,61 мг/мл	93,32	124,74
Цитрат натрия, дигидрат	Буферный агент	1,54 мМ	9,15	12,23
Трис-гидрохлорид	Буферный агент	18,46 мМ	58,76	78,55
Хлорид натрия	Модификатор тоничности	96,15 мМ	113,50	151,71
Маннит	Модификатор тоничности	1,15 %масса/объем	232,30	310,50
Пентетовая кислота <sup>16</sup>	Хелатор ионов металлов	93,85 мкМ	0,75	1,00
Полисорбат 80	Поверхностно-активное вещество	0,012 %масса/объем	2,42	3,24
Хлористоводородная кислота	Регулирование pH	q.s. до pH 6,3		
Гидроксид натрия <sup>17</sup>				
Вода для инъекции	Растворитель		q.s. до 20,2 мл	q.s. до 27,0 мл

<sup>16</sup>Также известная как диэтилентриаминпентауксусная кислота.

q.s.=в достаточном количестве предельное значение pH.

Коммерческие фармацевтические субстанции (DS) ипилимумаба и ниволумаба имеют критерии приемлемости по значению pH в диапазоне 6,6-7,6 (4°C) и 5,5-6,5, соответственно. Так как DP FDRC изготавливали без какой-либо дополнительной манипуляции с исходной фармацевтической субстанцией (DS), исследование проводили для того, чтобы понять потенциальный диапазон pH в DP FDRC вследствие изменчивости исходной DS.

Таблица 28  
Изменчивость pH в DP FDRC вследствие изменчивости исходной DS

20 мМ Трис-HCl	20 мМ цитрат натрия	Конечное значение pH	
		pH (4 °C)	pH (21 °C)
pH 6,6	pH 5,5	5,77	5,64
pH 7,0	pH 6,0	6,47	6,32
pH 7,6	pH 6,5	7,34	6,99

<sup>17</sup>Разбавленные растворы хлористоводородной кислоты и гидроксида натрия могут быть использованы для регулирования pH во время изготовления DS ниволумаба и ипилимумаба. Значение pH раствора не регулируют во время изготовления DP FDRC.

Растворы готовили путем добавления 42 мл 20 мМ Трис-HCl и 3,5 мл 20 мМ буфера на основе цитрата натрия для имитации изготовления DP FDRC. Результаты этой оценки (табл. 28) указывают на то, что диапазон pH DP FDRC может составлять 5,7-7,0 с целевым значением pH 6,2-6,3 при комнатной температуре. Этот показатель строго контролируется в исходных фармацевтических субстанциях (DS) ниволумаба и ипилимумаба, поэтому маловероятно, что DP FDRC будет подвергаться экстремально высоким значениям pH 5,7 или 7,0. Кроме того, на основании имеющихся данных по CQA ипилимумаба и ниволумаба можно предположить, что риск для показателей качества DP FDRC будет более высоким в диапазоне более высоких значений pH. На основании этого понимания проводили два дополнительных исследования для оценки влияния pH на показатели качества лекарственного препарата (DP), а также для того, чтобы понять влияние изменчивости различных вспомогательных веществ (включая pH) в исходной фармацевтической субстанции (DS) на показатели качества лекарственного препарата (DP).

Оценка данных, полученных в результате исследования при различных значениях pH, была нацелена на показатели качества FDRC, на которые влияет изменчивость pH, такие как профиль зарядов, контролируемый методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (icIEF), и высокомолекулярные агрегаты, контролируемые методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Отсутствует какое-либо заметное изменение профиля SEC DP FDRC в диапазоне pH 5,4-6,6 (комнатная температура) при рекомен-

даемых условиях хранения 2-8°C или в течение до 3 месяцев при 25°C. Поддающиеся количественной оценке изменения наблюдались только в ускоренных условиях (40°C), где было очевидно, что оцениваемый диапазон pH не влиял на профиль SEC (табл. 29).

Таблица 29

Мономер, HMW и LMW фракции (%) вследствие изменчивости pH

Прототип DP (pH)	HMW фракции (%)			Мономер (%)			LMW фракции (%)		
	Исх.	1M/40°C	3M/40°C	Исх.	1M/40°C	3M/40°C	Исх.	1M/40°C	3M/40°C
5,4	1,12	1,25	1,79	98,7	98,2	96,8	0,1	0,53	1,35
5,7	1,19	1,24	1,69	98,7	98,3	97,1	0,1	0,46	1,16
6,0	1,23	1,24	1,65	98,6	98,3	97,2	0,1	0,43	1,07
6,3	1,24	1,2	1,63	98,6	98,3	97,3	0,1	0,42	1,04
6,6	1,33	1,33	1,7	98,6	98,2	97,2	0,1	0,43	1,05

Профиль зарядов ипилимумаба и ниволумаба не показал каких-либо значительных различий, выходящих за рамки погрешности анализа при рекомендуемой температуре хранения 2-8°C через 6 месяцев, как показано в табл. 30. Профиль зарядов для ипилимумаба и ниволумаба оценивали в первую очередь при температуре хранения 25°C, так как различия являются более заметными, в отличие от 40°C, когда профиль резко изменяется и молекулы в значительной степени разрушаются. На фиг. 12 показан кислотный профиль ипилимумаба и ниволумаба в DP FDRC в сравнении с их соответствующими контролями при pH 6,0.

Таблица 30

Профиль кислотных и главных пиков (cIEF) вследствие изменчивости pH через 6 месяцев хранения при 5°C

Прототип DP (pH)	Профиль кислотного пика (%) (% Изменение от исходного уровня через 6M хранения при 5 °C)		Изменение главного пика (%) (% Изменение от исходного уровня через 6M хранения при 5 °C)	
	Ипилимумаб	Ниволумаб	Ипилимумаб	Ниволумаб
5,4	-1,0	-0,3	-1,0	-0,4
5,7	0,6	-3,7	1,4	-1,8
6,0	0,6	-1,5	0,8	-1,2
6,3	0,9	-2,3	1,5	-1,6
6,6	1,1	-1,9	1,6	-0,7

Кроме того, исследование устойчивости в зависимости от pH, проведенное с использованием переменных, показанных в табл. 31, в котором оцениваемый диапазон pH изменялся в интервале 5,8-7,0, привело к сходным наблюдениям для профилей SEC и cIEF.

Таблица 31

План исследования устойчивости DP

Прото- типа	Конечная конц. во флаконе (мг/мл)		рН	Трис	Цитрат	NaCl	Маннит	PS 80	DTPA
	Ипилимумаб (мг/мл)	Ниволумаб (мг/мл)		мM	мM	мM	% масса/ объем	% масса/ объем	мкM
1	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	76,92	1,38%	0,005	93,85
2	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	115,38	1,38%	0,020	93,85
3	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	76,92	0,92%	0,020	93,85
4	4,62	1,54	6,4	18,46	1,54	96,15	1,15%	0,012	93,85
5	4,62	1,54	7	18,46	1,54	115,38	1,38%	0,005	93,85
6	4,62	1,54	7	18,46	1,54	76,92	0,92%	0,005	93,85
7	4,62	1,54	6,4	18,46	1,54	96,15	1,15%	0,012	93,85
8	4,62	1,54	5,8	18,46	1,54	115,38	0,92%	0,005	93,85
9	4,62	1,54	7	18,46	1,54	115,38	0,92%	0,020	93,85
10	4,62	1,54	7	18,46	1,54	76,92	1,38%	0,020	93,85

HMW профиль DP FDRC оставался без изменений через 6 месяцев хранения при 2-8°C и 25°C, как показано на фиг. 13 (профиль мономера показан на фиг. 14), что указывает на отсутствие эффекта pH даже в присутствии других переменных, таких как концентрация хлорида натрия, маннита и PS80. Оценка профилей кислотных и главных пиков ипилимумаба и ниволумаба в DP FDRC (фиг. 15-18) четко указывает на зависимость дезамидирования от pH в ускоренных условиях при 25°C, на что указывает увеличение профиля кислотного пика в интервале более высоких температур при pH 7,0. Однако этот эффект в

ускоренных условиях не приводит к поддающемуся количественному измерению различию при рекомендуемой температуре хранения 2-8°C.

Профиль пика cIEF и влияние pH показаны на фиг. 19, и профиль iCIEF: диапазон pH 5,4-6,6 показан на фиг. 20.

Предельная концентрация полисорбата 80: не менее 60 мкг/мл.

Концентрацию полисорбата 80 в DP FDRC определяли прежде всего по количественному соотношению фармацевтических субстанций (DS) ипилимумаба и ниволумаба, смешанных для изготовления DP FDRC, при этом целевая концентрация PS 80 в DP FDRC составляет 120 мкг/мл, и при этом номинальная концентрация фармацевтических субстанций (DS) ипилимумаба и ниволумаба составляет 100 мкг/мл и 400 мкг/мл, соответственно. Не существует критерия приемлемости при выпуске для PS 80 для обеих фармацевтических субстанций (DS) ниволумаба и ипилимумаба; однако изготовитель DS ниволумаба и DS ипилимумаба имеет внутрипроизводственный предел, составляющий 275-525 мкг/мл и 60-140 мкг/мл, соответственно.

Предварительный анализ показателей DP, на которые влияет изменчивость PS80, не показал заметного изменения SEC HMW (%) (фиг. 13), а механические включения по данным HIAC в диапазоне 10-25 мкм отвечали критериям приемлемости USP. Кроме того, процесс изготовления DP FDRC разработан таким образом, что отсутствует необходимость в промывке фильтра перед заполнением флакона DP благодаря наличию промежуточного резервуара (35-40 л), расположенного после резервных стерильных фильтров, который заполняется до начала операции заполнения.

Кроме того, во время исследований по оптимизации DP диапазон концентраций PS 80, составляющий 120 мкг/мл-1000 мкг/мл, оценивали в DP FDRC в "наихудшем случае" (worst case) стягивания при 300 грп в течение до 72 ч на горизонтальном шейкере. Эти исследования при анализе на внешний вид показали отсутствие каких-либо видимых механических включений через 72 ч, и профиль SEC для всех прототипов не имел заметных отличий от начального момента времени. На основании этого было решено не изменять целевую концентрацию DP FDRC путем добавления концентрированного PS 80 на участке изготовления DP.

Однако для оценки потенциального риска образования механических включений или HMW фракций из-за значительно более низких уровней PS80 после разбавления инфузионными растворами, такими как солевой раствор, проводили исследование, в котором раствор DP FDRC, содержащий PS 80 с целевой концентрацией 120 мкг/мл, подвергали 20-кратному разбавлению (6 мкг/мл) 0,9% раствором хлорида натрия, и полученные растворы оценивали в течение до 24 ч по внешнему виду, на присутствие механических включений методом HIAC и содержание

HMW фракций (%) методом SEC. Это исследование показало, что снижение концентрации PS 80 до 6 мкг/мл в инфузионных растворах, полученных из FDRC DP, не вызывает никаких изменений по внешнему виду, профилю HMW или характеристикам HIAC раствора, что подтверждает целесообразность поддержания целевой концентрации на уровне 120 мкг/мл. Кроме того, предполагается, что DP FDRC будет разбавлен ~3-х кратно инфузионными растворами во время клинического и коммерческого введения, что приведет к получению концентрации PS 80, составляющей 40 мкг/мл. Предполагаемая концентрация PS 80, составляющая не менее 60 мкг/мл, все равно привела бы к конечной концентрации в инфузионном растворе, равной 20 мкг/мл, которая превышает концентрацию 6 мкг/мл, определенную в описанном выше исследовании на разбавление.

По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США 62/303855, поданной 4 марта 2016 г.; 62/269000, поданной 17 декабря 2015 г.; 62/265268, поданной 9 декабря 2015 г.; и 62/149325, поданной 17 апреля 2015 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционного заболевания или рака у субъекта, нуждающегося в этом, при этом фармацевтическая композиция содержит ипилимумаб и ниволумаб в соотношении 1:3, содержит 2,86 мг/мл ипилимумаба, 8,57 мг/мл ниволумаба, 1,86% мас./об. маннита, 78,57 mM NaCl, 65,71 мкM DTPA и 0,023% PS80, отличающаяся тем, что величина pH композиции равна 6,0.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая дигидрат цитрата натрия, Трис-HCl или и то, и другое.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что композиция:

- (a) является стабильной при температуре 5°C в течение по меньшей мере 1 недели;
- (b) является стабильной при температуре 40°C в течение по меньшей мере 1 недели или
- (c) является стабильной при температуре 25°C в течение по меньшей мере 1 недели.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что:

- (a) проявляет изменение кислотного пика, которое составляет менее чем 10% после хранения в течение 6 или 3 месяцев при температуре 5°C;

- (b) проявляет изменение кислотного пика, которое составляет менее чем 15% после хранения в течение 3 месяцев при температуре 25°C;
- (c) проявляет изменение кислотного пика, которое составляет менее чем 15% после хранения в течение 3 месяцев при температуре 40°C;
- (d) проявляет изменение высокомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 3 месяцев при температуре 4°C;
- (e) проявляет изменение высокомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 2 или 3 месяцев при температуре 25°C;
- (f) проявляет изменение высокомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 2 или 3 месяцев при температуре 40°C;
- (g) проявляет изменение главного пика в анализе методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 1 месяца при температуре 4°C;
- (h) проявляет изменение главного пика в анализе методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 1 месяца при температуре 25°C;
- (i) проявляет изменение главного пика в анализе методом капиллярного изоэлектрического фокусирования (cIEF), которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 1 месяца при температуре 40°C;
- (j) проявляет изменение низкомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 2 месяцев при температуре 40°C;
- (k) проявляет изменение низкомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 2 месяцев при температуре 25°C; или
- (l) проявляет изменение низкомолекулярного пика, которое составляет менее чем 5% после хранения в течение 2 месяцев при температуре 4°C.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что рак представляет собой меланому, рак почки, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак легких, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак яичника, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, карциному фалlopиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак парашитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягкой ткани, рак мочеиспускательного канала, рак полового члена, хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоли спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермойдный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак, индуцированные условиями окружающей среды раковые заболевания, включая раковые заболевания, индуцированные асбестом, и любые их комбинации.

## Коммерческие лекарственные формы ипилимумаба и ниволумаба

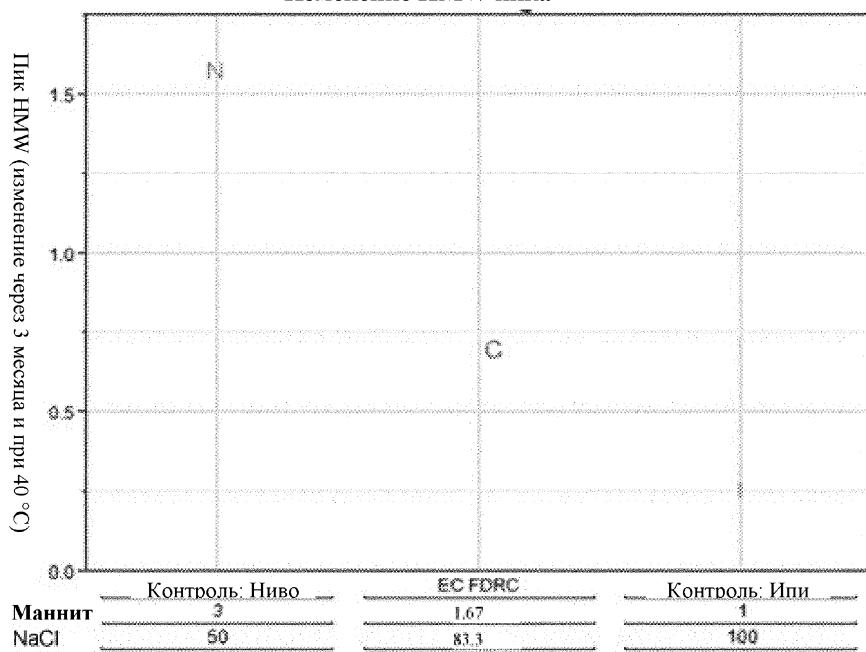
Композиция ипилимумаба	DS	DP	Композиция ниволумаба	DS	DP
Тип	IgG1; Мол. масса: 147991 Дальтон		Тип	IgG1; Мол. масса: 143567 Дальтон	
pI:	8.7-8.8		pI:	8.0-8.1	
BMS-734016	5 мг/мл	5 мг/мл	BMS-936558	20 мг/мл	10 мг/мл
Трис-HCl, USP	20 мМ	20 мМ	Цитрат натрия, дигидрат, USP	20 мМ	20 мМ
pH	7.0	7.0	pH	6.0	6.0
Хлорид натрия, USP	100 мМ	100 мМ	Хлорид натрия, USP	50 мМ	50 мМ
Маннит (%масса/объем), USP	1.0 %	1.0%	Маннит (%масса/объем), USP	3.0 %	3.0 %
Пентетовая кислота (DTPA), USP	100 мкМ	100 мкМ	Пентетовая кислота (DTPA), USP	20 мкМ	20 мкМ
Полисорбат 80, NF	0.01 %	0.01%	Полисорбат 80, NF	0.04 %	0.02 %
Концентрации (объемы наполнения): 50 мг (10 мл в 10 мл флаконе) и 200 мг (40 мл в 50 мл флаконе) Отд. операции для DP: полный цикл производства			Концентрация (объем наполнения): 100 мг (10 мл в 10 мл фл. Отдельные операции: разбавление, наполнение и все последующие операции		

DS: Фармацевтическая субстанция; DP: Лекарственный препарат

Фиг. 1

Лекарственная форма, содержащая комбинацию с фиксированным соотношением доз (1:1) ниволумаба и ипилимумаба. Изменение HMW профиля (через 3 месяца хранения при 40°C)

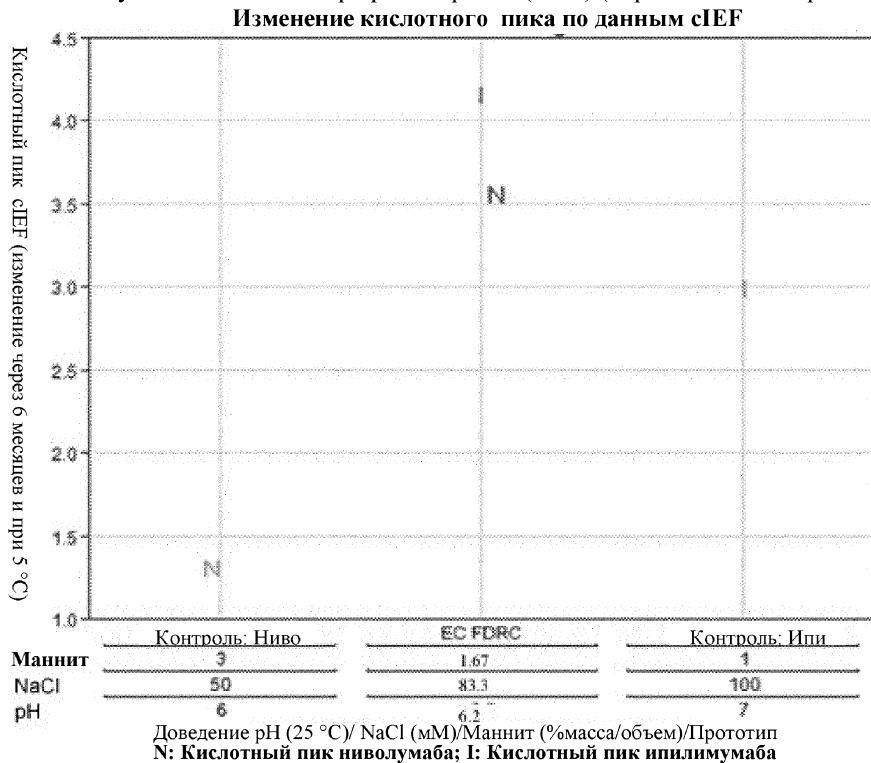
## Изменение HMW пика



Доведение pH (25 °C)/PS80 (%масса/объем)/NaCl (мМ)/Маннит (%масса/объем)/Прототип  
N: HMW пик ниволумаба; C: Объединенный HMW пик ; I: HMW пик ипилимумаба

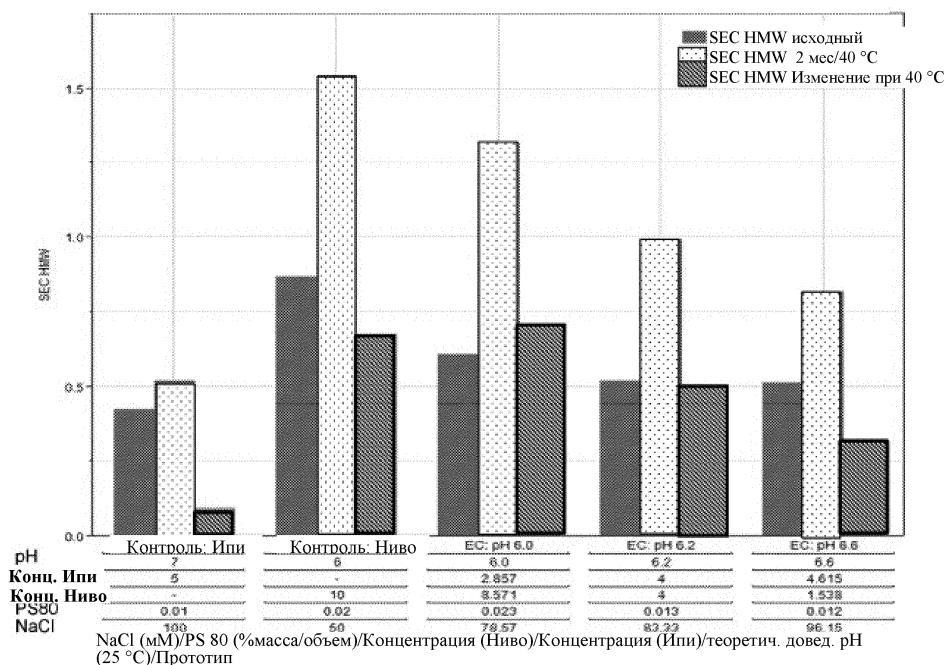
Фиг. 2А

Лекарственная форма, содержащая комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:1 ниволумаба и ипилимумаба Изменение профиля зарядов (cIEF) (через 6 месяцев хранения при 5°C)



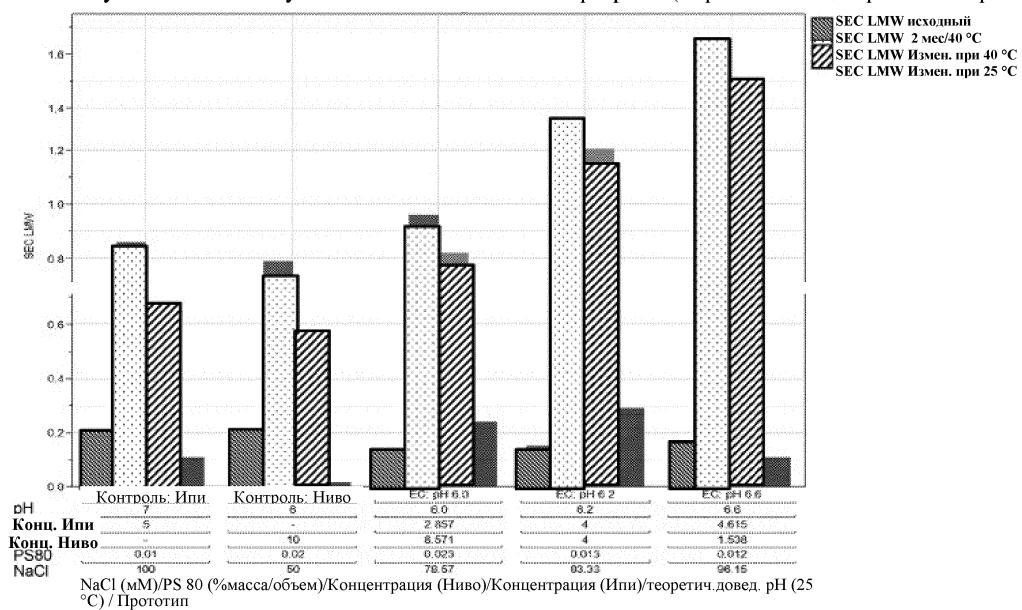
Фиг. 2В

Лекарственная форма, содержащая комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 ниволумаба и ипилимумаба: изменение HMW профиля (через 2 месяца хранения при 40°C)



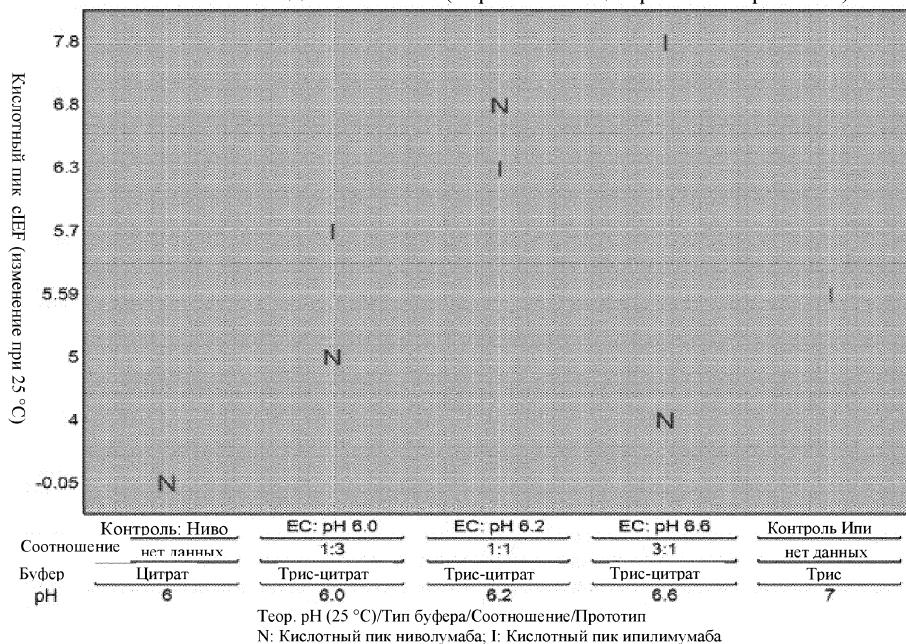
Фиг. 3А

Лекарственные формы, содержащие комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 ниволумаба и ипилимумаба: изменение LMW профиля (через 2 месяца хранения при 40°C)



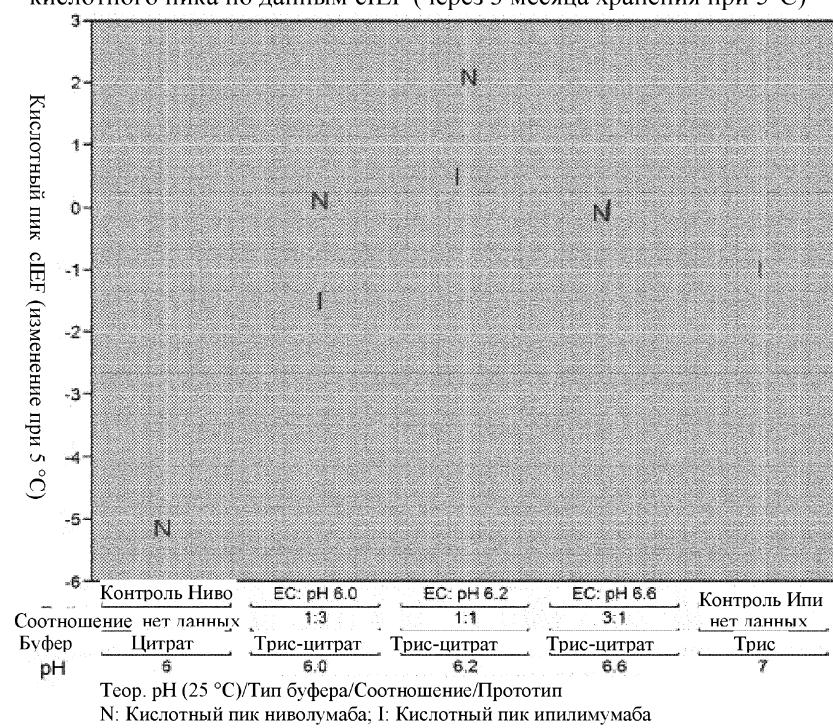
Фиг. 3В

Лекарственные формы, содержащие комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 ниволумаба и ипилимумаба: изменение кислотного пика по данным cIEF (через 3 месяца хранения при 25°C)



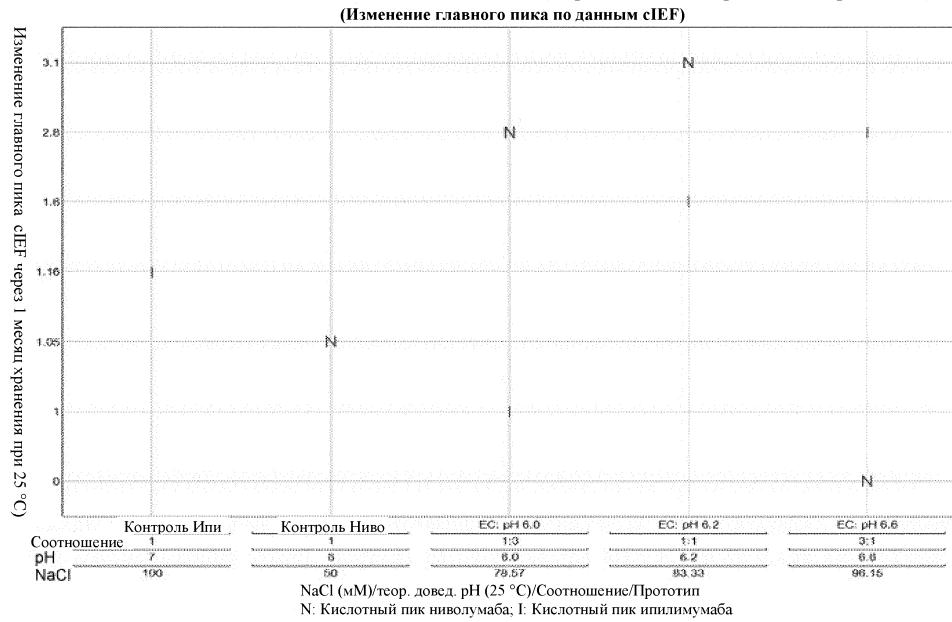
Фиг. 4А

Лекарственные формы, содержащие комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 ниволумаба и ипилимумаба: изменение кислотного пика по данным сIEF (через 3 месяца хранения при 5°C)



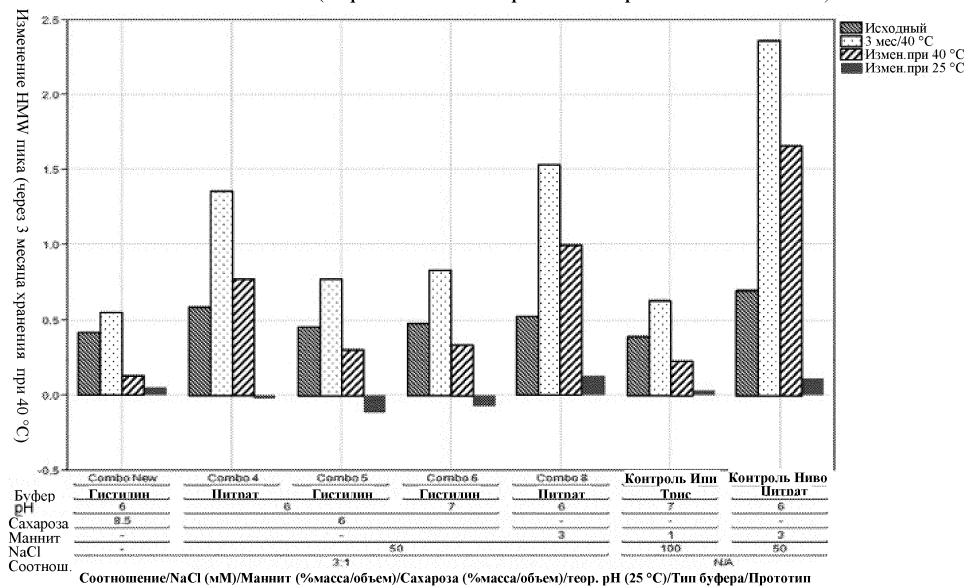
Фиг. 4В

Лекарственные формы, содержащие комбинацию с фиксированным соотношением доз 1:3, 1:1 или 3:1 ниволумаба и ипилимумаба: изменение кислотного пика по данным сIEF (через 1 месяц хранения при 25°C)  
(Изменение главного пика по данным сIEF)



Фиг. 4С

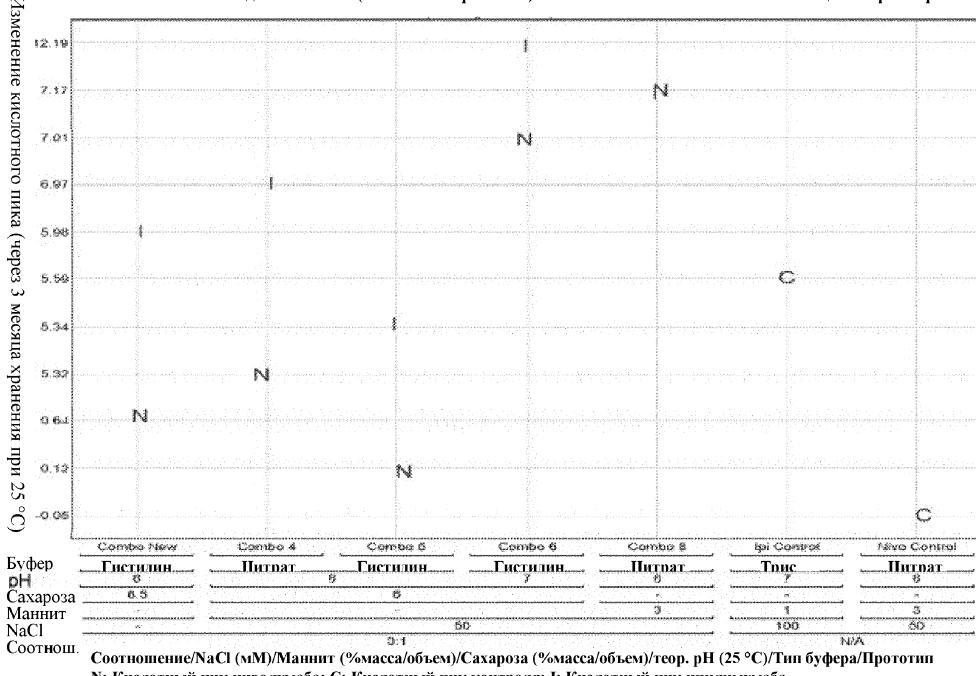
DoE FDRC (3:1) - новые лекарственные формы. Изменение HMW  
по данным SEC (через 3 месяца хранения при 40°C или 25°C)



Фиг. 5А

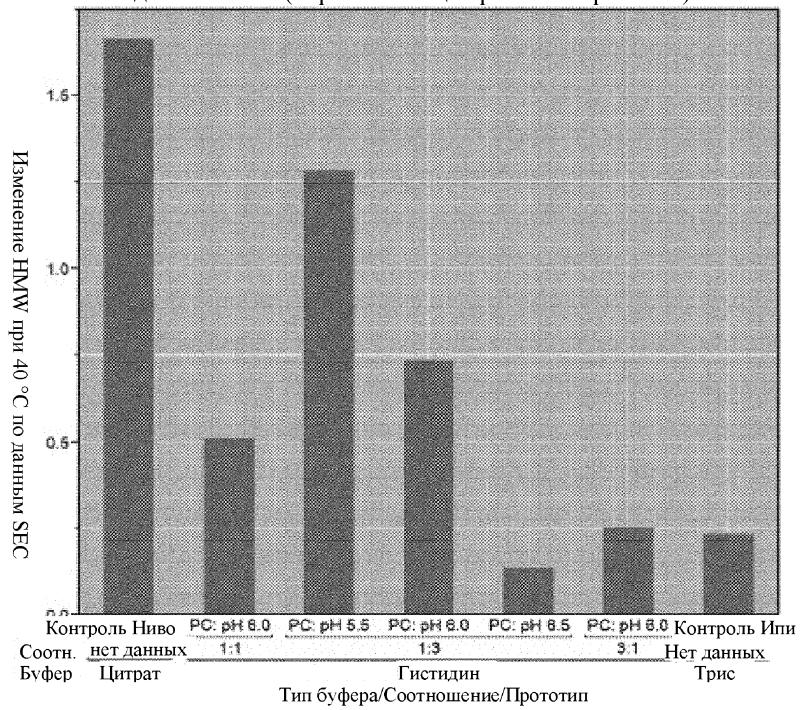
DoE FDRC (3:1) - новые лекарственные формы. Кислотный  
пик по данным cIEF (через 3 месяца хранения при 25°C)

Кислотный пик по данным cIEF (изменение при 25 °C) в зависимости от соотношения и еще 6 параметров



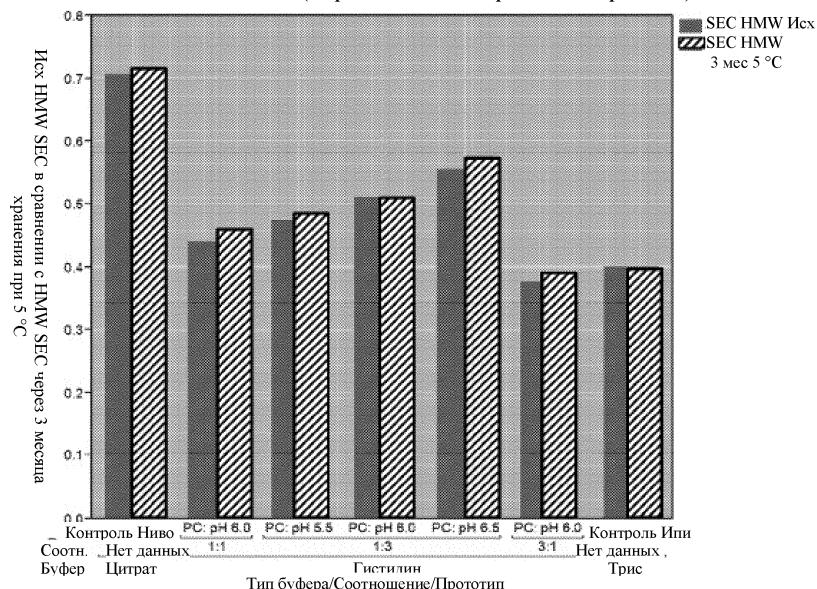
Фиг. 5В

FDRС на объединенной платформе (РС). Изменение HMW по данным SEC (через 3 месяца хранения при 40°C)



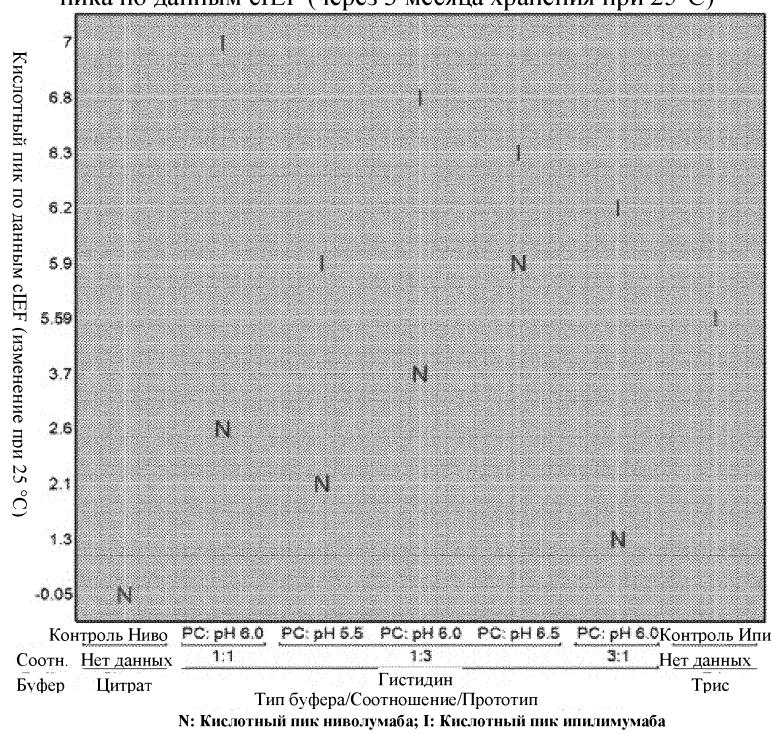
Фиг. 6А

FDRС на объединенной платформе (РС). Изменение HMW по данным SEC (через 3 месяца хранения при 5°C)



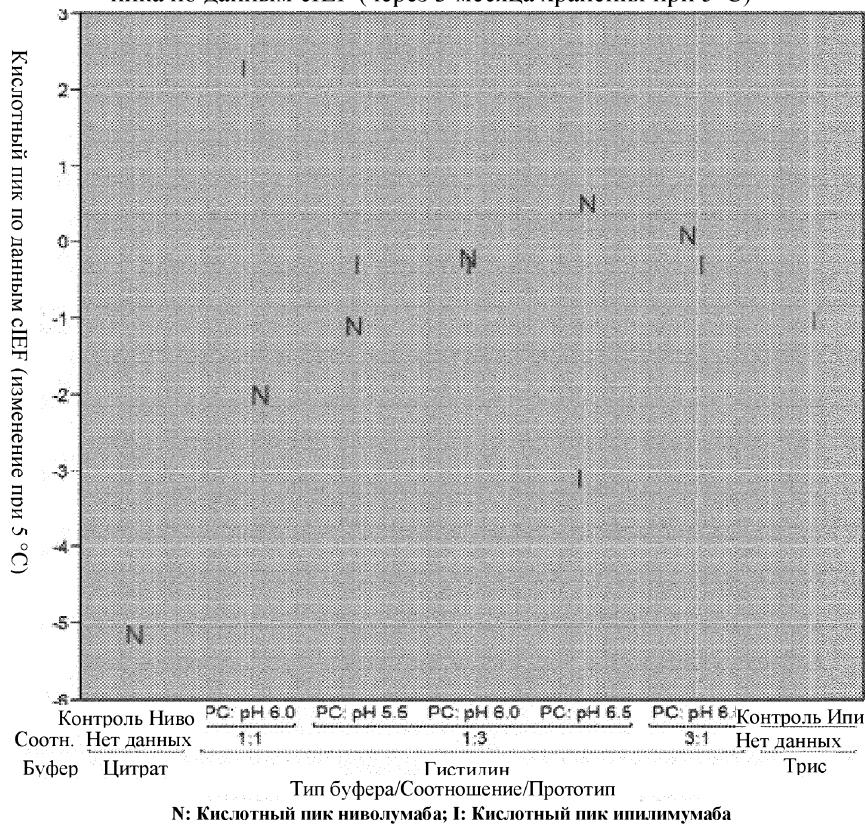
Фиг. 6В

FDRC на объединенной платформе (PC). Изменение кислотного пика по данным сIEF (через 3 месяца хранения при 25°C)



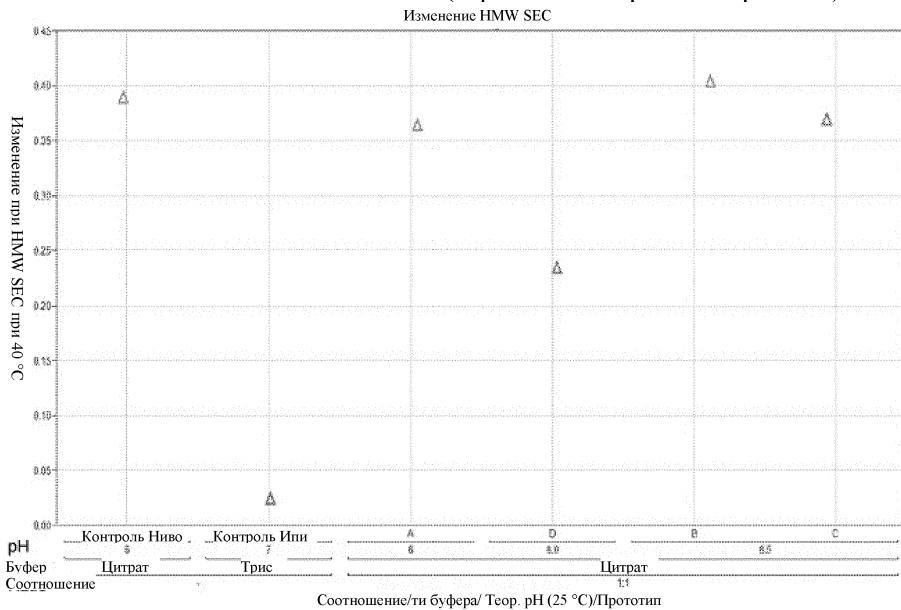
Фиг. 7А

FDRC на объединенной платформе (PC). Изменение кислотного пика по данным сIEF (через 3 месяца хранения при 5°C)



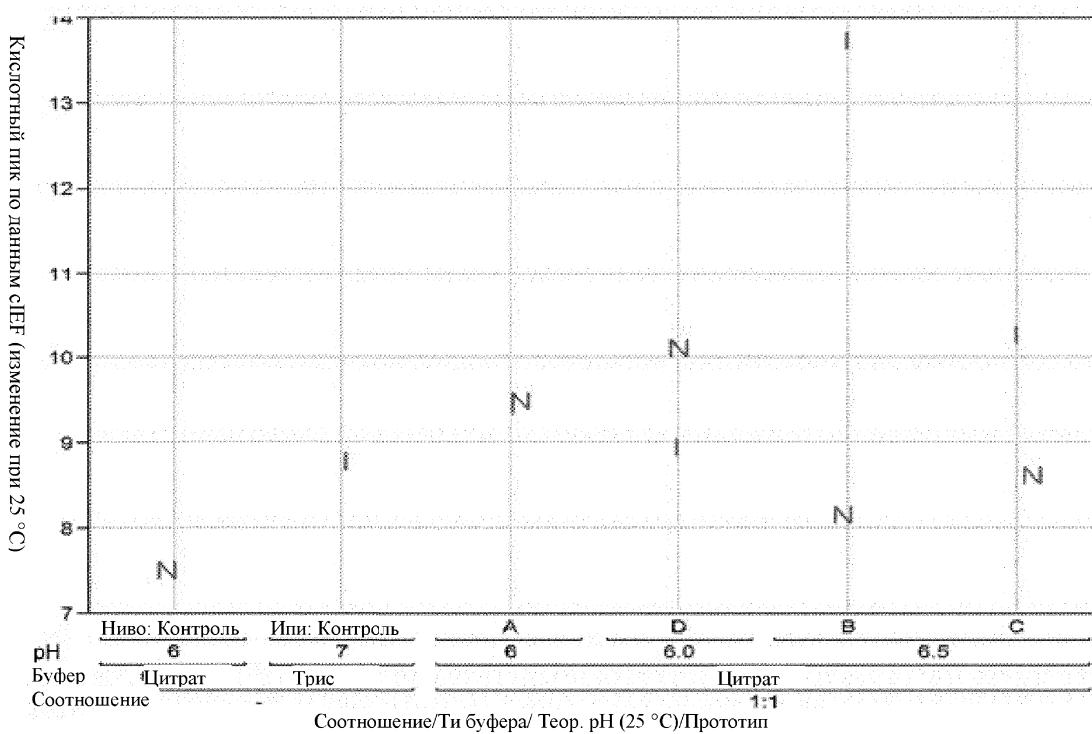
Фиг. 7В

Лекарственные формы, содержащие FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба.  
Изменение HMW по данным SEC (через 1 месяц хранения при 40°C)



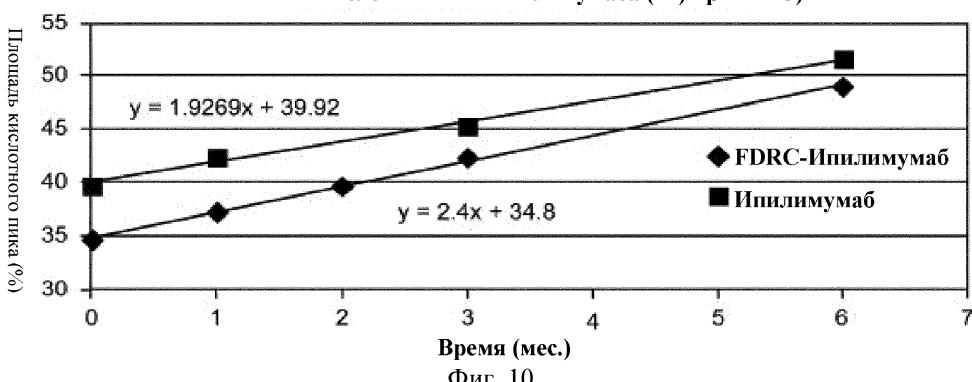
Фиг. 8

Лекарственные формы, содержащие FDRC (1:1) на основе DP ниволумаба.  
Изменение кислотного пика по данным сIEF (через 3 месяца хранения при 25°C)



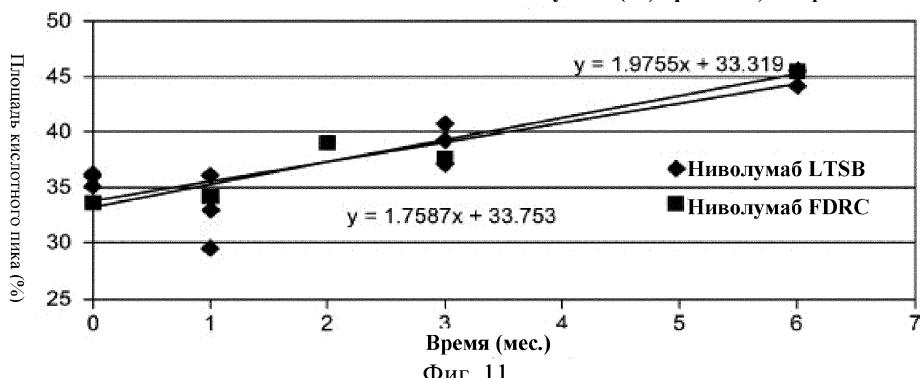
Фиг. 9

Скорость деградации ипилимумаба, оцененная по изменению площади кислотного пика, в FDRC и коммерческой композиции при 25°C/60% RH  
**Кислотный пик ипилимумаб (%) при 25 °C)**



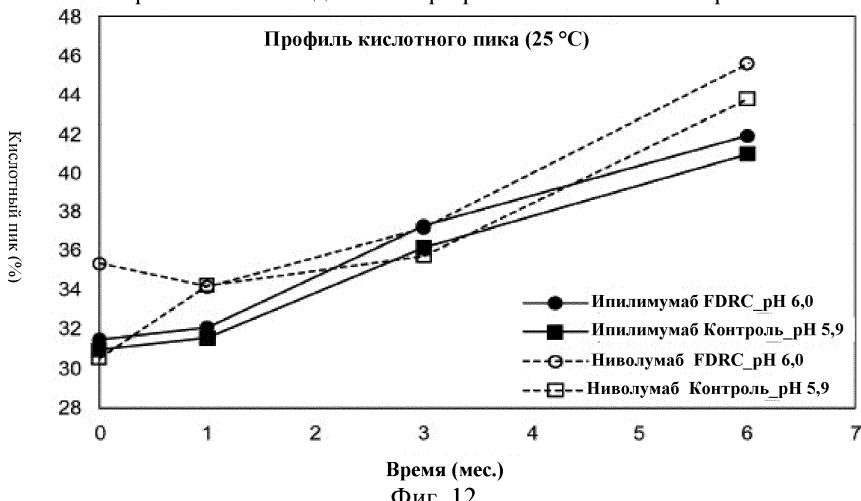
Фиг. 10

**Кислотный пик ниволумаба (%) в FDRC и коммерческой композиции при 25°C/60%RH  
Изменение кислотного пика ипилимумаба (%) при 25 °C) во времени**



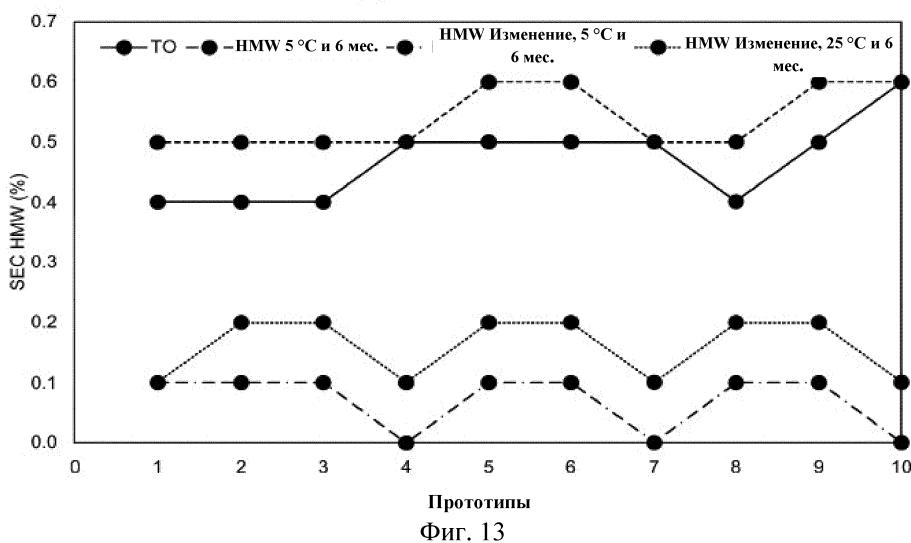
Фиг. 11

Профиль кислотного пика ипилимумаба и ниволумаба при 25°C в исследовании при различных значениях pH



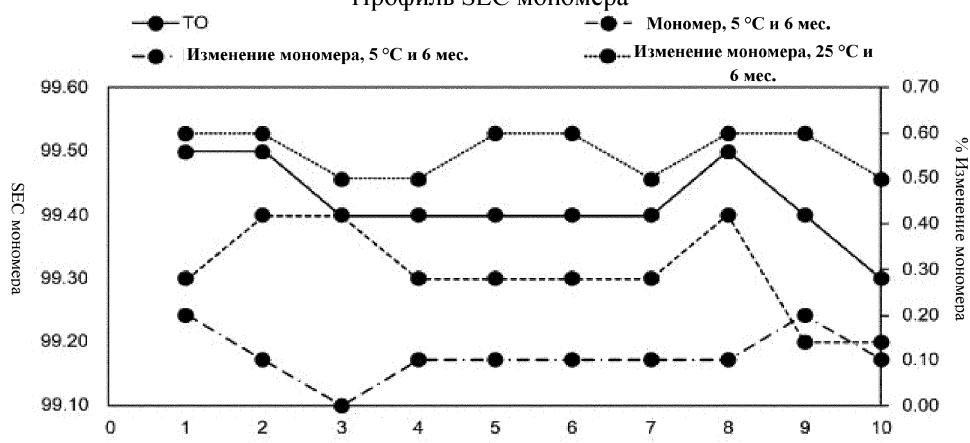
Фиг. 12

HMW профиль SEC прототипов DP в исследовании устойчивости  
HMW профиль SEC (%) через 6 месяцев при 5 °C



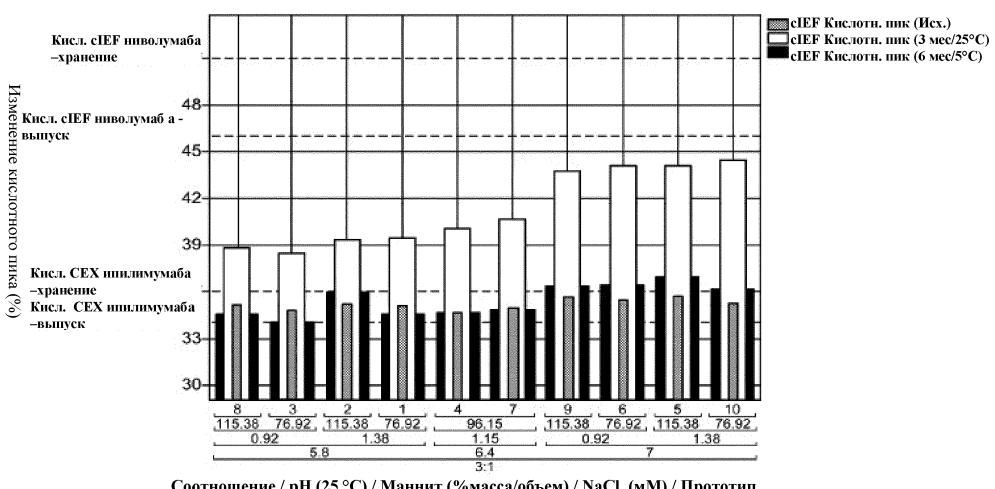
Фиг. 13

Профиль SEC мономера



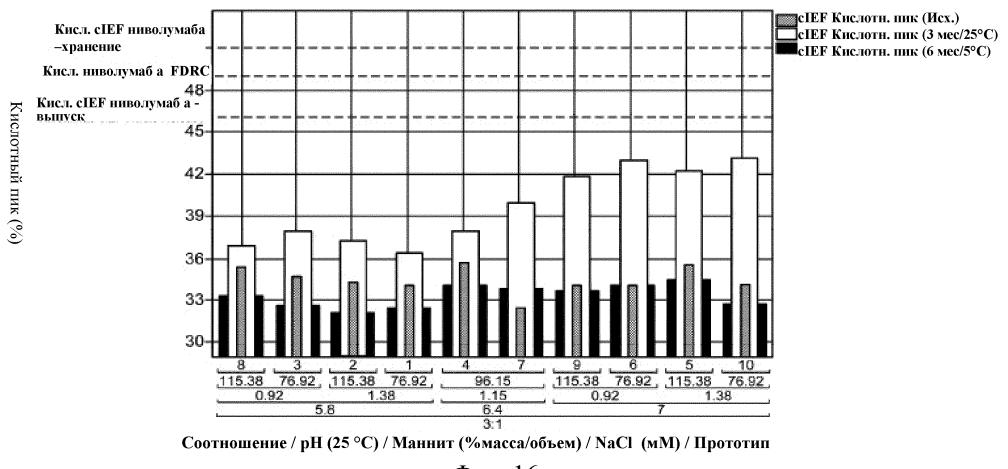
Фиг. 14

Профиль кислотного пика ипилимумаба



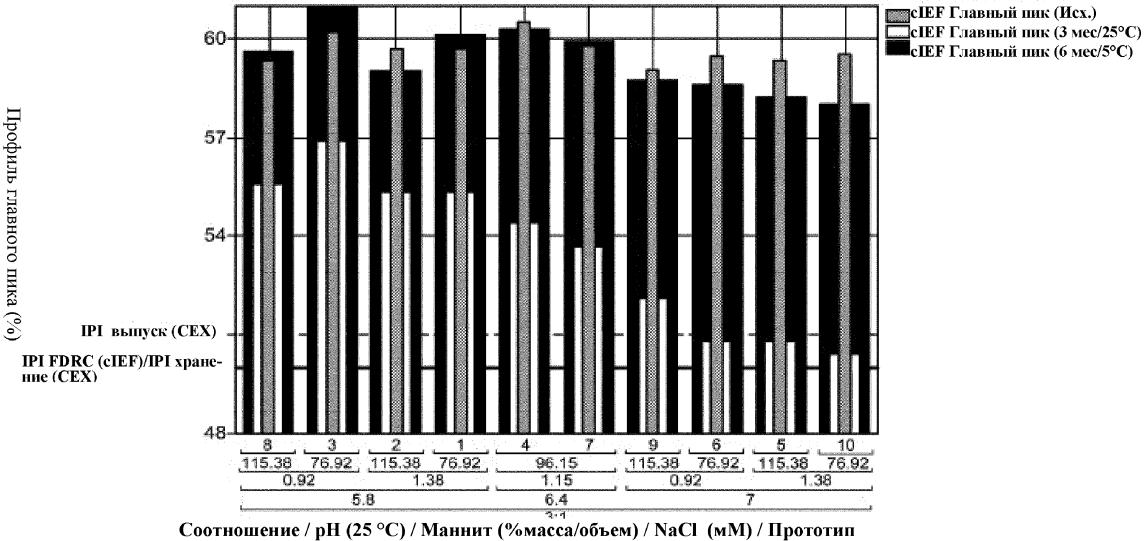
Фиг. 15

## Профиль кислотного пика ипилимумаба



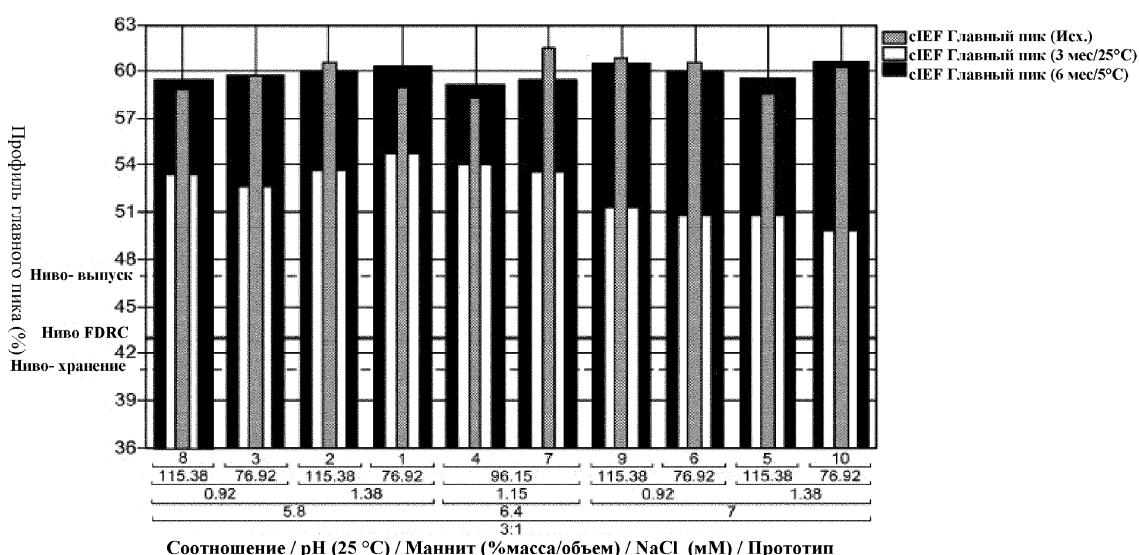
Фиг. 16

## Профиль главного пика ипилимумаба



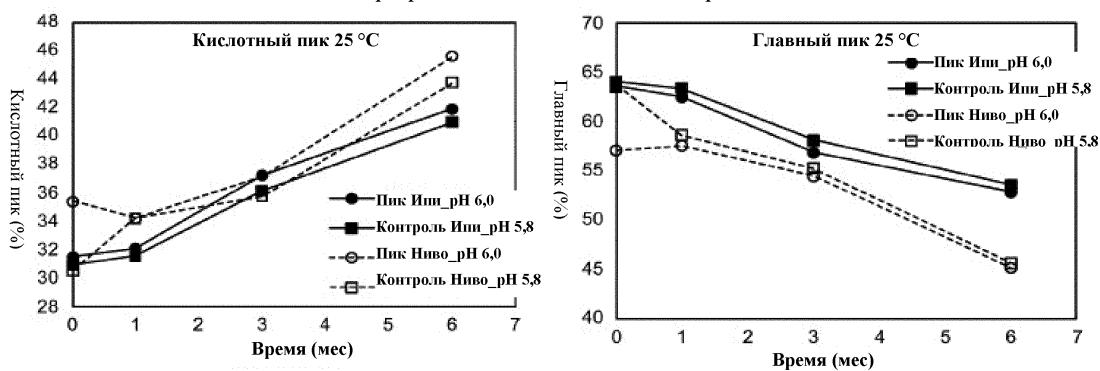
Фиг. 17

## Профиль главного пика ниволумаба



Фиг. 18

## Профиль сIEF пиков: влияние pH



Изменение кислотного пика при 5 °C

	pH 5.4	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	Контроли
Пик Ини 6 м	-1	0.6	0.6	0.9	1.1	1
Пик Ниво 6 м	-0.3	-3.7	-1.5	-2.3	-1.9	-0.4

Изменение главного пика при 5 °C

	pH 5.4	pH 5.7	pH 6.0	pH 6.3	pH 6.6	Контроли
Пик Ини 6 м	-1	1.4	0.8	1.5	1.6	0.6
Пик Ниво 6 м	-0.4	-1.8	-1.2	-1.6	-0.7	0.9

Фиг. 19

## Профиль сIEF: диапазон pH 5,4-6,6

## Скорость изменения кислотного и главного пика ипилимумаба/месяц

Примечание: данные за 3 месяца для 25 °C и 5 °C

DP	Кислотный пик (%/месяц)	Кислотный пик (%/месяц)	Главный пик (%/месяц)	Главный пик (%/месяц)
	25°C	5°C	25°C	5°C
FDRC (5.4)	1.86	0.3	-2.15	-0.4
FDRC (5.7)	2.11	0.27	-2.57	-0.4
FDRC (6.0)	2.03	0.17	-2.32	-0.26
FDRC (6.3)	2.1	0.1	-2.04	-0.23
FDRC (6.6)	2.63	0.47	-2.67	-0.7

## Скорость изменения кислотного и главного пика ниволумаба/месяц

Примечание: данные за 3 месяца для 25 °C и 5 °C

DP	Кислотный пик (%/месяц)	Кислотный пик (%/месяц)	Главный пик (%/месяц)	Главный пик (%/месяц)
	25°C	5°C	25°C	5°C
FDRC (5.4)	1.15	-0.33	-2.15	0.33
FDRC (5.7)	-0.08	-0.6	-0.96	0.36
FDRC (6.0)	0.72	-0.03	-0.96	0.5
FDRC (6.3)	0.8	-0.4	-1.16	0.36
FDRC (6.6)	1.7	-0.07	-1.71	0.1

Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2