



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
A61K 39/395 (2019.02); C07K 16/24 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2015150149, 29.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.04.2014

Дата регистрации:  
06.06.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
29.04.2013 US 61/816,899;  
05.02.2014 EP 14305160.5

(43) Дата публикации заявки: 05.06.2017 Бюл. № 16

(45) Опубликовано: 06.06.2019 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 30.11.2015

(86) Заявка РСТ:  
EP 2014/058733 (29.04.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/177568 (06.11.2014)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спаская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):  
КАРАЙОН Софи (FR),  
БУССИФ Отман (FR)

(73) Патентообладатель(и):  
САНОФИ (FR)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012125775 A1, 20.09.2012. US  
2012121580 A1, 05.17.2012. WO 2009052081  
A2, 23.04.2009. RU 2007103826 A, 10.08.2008.

## (54) СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К IL-4/IL-13

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, а именно к фармакологии, и может быть использована в качестве стабильных фармацевтических составов на основе антител. Предложен стабильный состав на основе антитела, содержащий биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий агент, буферную систему, поддерживающую рН 7,

маннит. Концентрация солей в составе составляет 15 мМ. Также предложен стабильный лиофилизированный состав на основе антитела. Группа изобретений обеспечивает стабильность лиофилизированного состава на основе антитела IL-4/IL-13 при его получении и хранении. 2 н. и 28 з.п. ф-лы, 31 табл., 8 пр., 34 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/24* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/395 (2019.02); C07K 16/24 (2019.02)*(21)(22) Application: **2015150149, 29.04.2014**(24) Effective date for property rights:  
**29.04.2014**Registration date:  
**06.06.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**29.04.2013 US 61/816,899;**  
**05.02.2014 EP 14305160.5**(43) Application published: **05.06.2017 Bull. № 16**(45) Date of publication: **06.06.2019 Bull. № 16**(85) Commencement of national phase: **30.11.2015**(86) PCT application:  
**EP 2014/058733 (29.04.2014)**(87) PCT publication:  
**WO 2014/177568 (06.11.2014)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,**  
**OOO "Yuridicheskaya firma Gorodiskij i**  
**Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KARAJON Sofi (FR),**  
**BUSSIF Otman (FR)**

(73) Proprietor(s):

**SANOFI (FR)**(54) **COMPOSITIONS BASED ON BISPECIFIC ANTIBODIES TO IL-4/IL-13**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to pharmacology, and can be used as stable pharmaceutical compositions based on antibodies. Disclosed is a stable antibody-based formulation containing a bispecific IL-4/IL-13 antibody or antigen-binding agent thereof, a buffer system which maintains pH 7 and mannitol.

Concentration of salts in composition is 15 mM. Invention also discloses a stable lyophilized antibody-based formulation.

EFFECT: group of inventions provides stability of the lyophilized composition based on the IL-4/IL-13 antibody during preparation and storage thereof.

30 cl, 31 tbl, 8 ex, 34 dwg

RU 2 690 850 C 2

RU 2 690 850 C 2

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предусматривает стабильные фармацевтические составы на основе антител, в том числе лиофилизированные составы, содержащие биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 и буферную систему, где pH состава составляет приблизительно pH 7, и где состав характеризуется низкой концентрацией солей в целях снижения ионной силы состава. Составы необязательно могут дополнительно содержать неионогенное поверхностно-активное вещество, сахар и/или неионогенный стабилизатор. Составы можно применять в лечении различных заболеваний.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как IL-4, так и IL-13 являются терапевтически важными цитокинами, что обусловлено их биологическими функциями, и играют критически важные роли во многих заболеваниях, включая астму (Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005, Vol. 5, 161-166). Было показано, что IL-4 способен подавлять аутоиммунные заболевания, и как IL-4, так и IL-13 продемонстрировали возможность усиления противоопухолевых иммунных ответов. Поскольку оба цитокина вовлечены в патогенез аллергических заболеваний, ингибиторы этих цитокинов могут обеспечивать терапевтические эффекты.

В целях разработки фармацевтического состава, содержащего биспецифическое антитело к IL-4/IL-13, подходящее для подкожного введения, концентрацию антитела необходимо увеличить до приблизительно 100 мг/мл или более. Однако, при таких высоких концентрациях может возникнуть много осложнений, в том числе повышение вязкости, сдвиг pH, изменение цвета раствора и образование видимых и не видимых невооруженным глазом частиц. Составление антитела дополнительно осложняется тем, что оно весьма склонно к агрегации при высоких концентрациях. Тогда как менее 5% типичных антител обычно образуют высокомолекулярные агрегаты (HMW) в течение периода времени 4 лет при 5°C, биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 образует HMW при скорости 0,5-1% в час при 25°C и при 0,1% в час при 5°C. Более того, это антитело обладает настолько сильной склонностью к агрегации, что его нельзя составить в жидкой форме в целевом диапазоне концентраций. Наконец, биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 имеет чрезвычайно низкую изоэлектрическую точку, что осложняет его составление в связи с проблемами растворимости. Например, биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 имеет изоэлектрическую точку от 5,8 до 6,2, тогда как большинство антител имеют изоэлектрическую точку от 8 до 10.

Соответственно, существует необходимость в улучшенных и стабильных фармацевтических составах, в которых эти осложнения могут быть устранены.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для удовлетворения этих и других потребностей в данном документе предусмотрены высокостабильные составы на основе биспецифических антител к IL-4/IL-13. Высокостабильные составы на основе биспецифических антител к IL-4/IL-13 были неожиданно выявлены в форме жидкостей и лиофилизированных порошков, содержащих биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 и буферную систему, где pH состава составляет приблизительно pH 7, и где состав характеризуется низкой концентрацией солей в целях снижения ионной силы состава. Составы необязательно могут дополнительно содержать неионогенное поверхностно-активное вещество, сахар и/или неионогенный стабилизатор. Данные составы улучшены относительно традиционных составов, в которых повышение концентрации антитела в составе часто приводит к образованию молекулярных агрегатов (HMW) антитела и образованию видимых и не видимых невооруженным глазом частиц. В частности, составы по настоящему изобретению проявляют хорошую стабильность в отношении видимых частиц, не видимых невооруженным глазом частиц,

низкомолекулярных белков и высокомолекулярных белков.

В варианте осуществления настоящее изобретение предусмотрен стабильный состав на основе антитела, содержащий: биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие легкую цепь формулы VL1-линкер-VL2 и тяжелую цепь формулы VH1-линкер-VH2, где VL1 и VH1 образуют антиген-связывающий домен для IL-13, а VL2 и VH2 образуют антиген-связывающий домен для IL-4; и буферную систему, подходящую для поддержания pH состава при приблизительно pH 7; и где состав характеризуется низкой концентрацией солей в целях снижения ионной силы состава.

В конкретных вариантах осуществления VL1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 1; VH1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 2; VL2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 3; а VH2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 4 или 5. В альтернативных конкретных вариантах осуществления VL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; VH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; VL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; а VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5.

В конкретных вариантах осуществления легкая цепь имеет формулу N-VL1-линкер-VL2-CL, где CL представляет собой константный домен легкой цепи антитела, и где тяжелая цепь имеет формулу N-VH1-линкер-VH2-CH1-CH2-CH3, где CH2-CH3 соответствует Fc-домену антитела. В конкретных вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент дополнительно содержат домен константной области. В конкретных вариантах осуществления домен константной области выбран из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CL.

В конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент представляют собой гуманизованное биспецифическое антитело IgG4 или его антиген-связывающий фрагмент.

В конкретных вариантах осуществления концентрация антитела или его антиген-связывающего фрагмента составляет приблизительно 100 мг/мл.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения буферная система содержит по меньшей мере два буфера. В конкретных вариантах осуществления концентрация буферной системы составляет приблизительно 10 мМ. В конкретных вариантах осуществления буферная система содержит Tris-буфер и фосфатный буфер. В конкретных вариантах осуществления концентрация Tris-буфера составляет приблизительно 3,7 мМ. В конкретных вариантах осуществления концентрация фосфатного буфера составляет приблизительно 6,3 мМ. В конкретных вариантах осуществления концентрация Tris-буфера составляет приблизительно 3,7 мМ, а концентрация фосфатного буфера составляет приблизительно 6,3 мМ.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения состав дополнительно содержит неионогенное поверхностно-активное вещество. В конкретных вариантах осуществления концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества составляет от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,2% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В конкретных вариантах осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 80. В конкретных вариантах осуществления концентрация полисорбата 80 составляет от приблизительно 0,05% до приблизительно

0,2% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления концентрация полисорбата 80 составляет приблизительно 0,2% (вес/об.).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения состав дополнительно содержит сахар. В конкретных вариантах осуществления концентрация сахара составляет приблизительно 5% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления сахар представляет собой дисахарид. В конкретных вариантах осуществления дисахарид представляет собой сахарозу. В конкретных вариантах осуществления концентрация сахарозы составляет приблизительно 5% (вес/об.).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения состав дополнительно содержит неионогенный стабилизатор. В конкретных вариантах осуществления концентрация неионогенного стабилизатора составляет от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления неионогенный стабилизатор представляет собой аминокислоту либо сахар. В конкретных вариантах осуществления аминокислота представляет собой пролин. В конкретных вариантах осуществления сахар представляет собой маннит. В конкретных вариантах осуществления концентрация пролина составляет от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления концентрация пролина составляет приблизительно 3% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления концентрация маннита составляет приблизительно 3% (вес/об.).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения состав представляет собой лиофилизированный состав.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения состав проявляет хорошую стабильность в отношении видимых частиц, не видимых невооруженным глазом частиц, низкомолекулярных белков и высокомолекулярных белков.

В варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен стабильный лиофилизированный состав на основе антитела, содержащий: приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3; приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ; приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80; приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и приблизительно 3% (вес/об.) пролина; где рН состава составляет приблизительно рН 7.

В варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен стабильный лиофилизированный состав на основе антитела, содержащий: приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3; приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ; приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80; приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и приблизительно 3% (вес/об.) маннита; где рН состава составляет приблизительно рН 7.

В варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен набор,

включающий емкость, содержащую состав по настоящему изобретению и инструкции по введению и применению состава.

В варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ лечения аллергического заболевания, рака, астмы, заболевания, ассоциированного с аномальной выработкой IL-4 и/или IL-13, или заболевания, ассоциированного с усиленным ответом, опосредованным TN-2, включающий введение состава по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Фигура 1 представляет собой схематическое изображение, на котором показана иллюстративная молекула биспецифического антитела к IL-4/IL-13, содержащая две легкие цепи и две тяжелые цепи. Две легкие цепи содержат компонент N-VL<sub>hB-B13</sub>-линкер-VL<sub>h8D4-8</sub>-CL-C, а две тяжелые цепи содержат компонент N-VH<sub>hB-B13</sub>-линкер-VH<sub>h8D4-8</sub>-CH1-CH2-CH3-C. Последовательность линкера содержит (G4S)<sub>2</sub> или GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

На фигуре 2 проиллюстрированы аминокислотные последовательности иллюстративного антитела, т.е. гуманизированные вариабельные домены антитела B-B13 к IL-13 (SEQ ID NO: 1 и 2) и гуманизированные вариабельные домены антитела 8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 3, 4 и 5). Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны последовательности CDR (SEQ ID NO: 7-21).

Фигура 3 представляет собой группу изображений, на которых показано загрязнение частицами в анализе № P5 (подбор pH буфера) после встряхивающего воздействия.

Фигура 4 представляет собой график, на котором показано загрязнение не видимыми невооруженным глазом частицами >1,5 мкм после нескольких видов воздействия в анализе № P6 (подбор pH буфера).

Фигура 5 представляет собой график, на котором показано загрязнение не видимыми невооруженным глазом частицами > 10 мкм после нескольких видов воздействия в анализе № P6 (подбор pH буфера).

Фигура 6 представляет собой график, на котором показан уровень NMW в анализе № P6 (подбор pH буфера) после термического воздействия.

Фигура 7 представляет собой график, на котором показаны SEC-хроматограммы в анализе № P5 (подбор pH буфера) через 2 недели при 45°C.

Фигура 8 представляет собой изображение геля для SDS-PAGE в анализе № P5 (подбор pH буфера) через 2 недели при 45°C.

Фигура 9 представляет собой изображение геля для IEF через 2 недели при 45°C в анализах №№ P5 и 6 (подбор pH буфера).

Фигура 10 представляет собой график, на котором показан уровень NMW после завершения программы воздействия в анализе № P13 (эффект солей).

На фигуре 11 показаны изображения фотографий, полученных при помощи бинокулярного микроскопа в анализе № P12 (поверхностно-активное вещество) после механического воздействия.

Фигура 12 представляет собой график, на котором показано отслеживание уровня NMW в анализе № P12 (поверхностно-активное вещество) при хранении в течение 6 недель при 5°C.

Фигура 13 представляет собой график, на котором показано отслеживание уровня NMW в анализе № P12 (добавка) при хранении в течение 6 недель при 5°C.

Фигура 14 представляет собой график, на котором показано отслеживание уровня

HMW в анализе № P20-FDS (добавка) при хранении в течение 4 недель при 5°C.

Фигура 15 представляет собой график, на котором показано отслеживание уровня HMW в анализе № P21 (добавка) при хранении в течение 2 недель при 5°C.

5 Фигура 16 представляет собой график зависимости обратного показателя содержания мономеров от времени при сравнении 1% пролина с 3% пролином в лидерном составе.

Фигура 17 представляет собой график последовательно наблюдаемой температуры в ходе способа сублимационной сушки состава № P16-1.

На фигуре 18 показаны изображения осадка № P18-1 во флаконе из прессованного стекла на 15 мл.

10 Фигура 19 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P14 (добавка) после завершения способа лиофилизации.

Фигура 20 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P20 (добавка) после лиофилизации.

15 Фигура 21 представляет собой график, на котором показан уровень HMW (а) и изображения (b) после завершения цикла замораживание-размораживание для несоставленного DS (анализ № 9).

Фигура 22 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P14 (добавка) после разбавления.

20 Фигура 23 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P20 (добавка) после разбавления.

Фигура 24 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P17 (добавка) после хранения и разбавления осадка.

Фигура 25 представляет собой график, на котором показан уровень HMW в анализе № P20 (добавка) после хранения и разбавления осадка.

25 Фигура 26 представляет собой график, на котором показаны результаты DSC для первого подбора (анализы №№ H04-150-172 - подбор pH буфера).

На фигуре 27 показаны изображения визуального аспекта составов с гистидином и сукцинатом (анализы №№ P-H04-144 и 148, №№ H04-150 A1-A6).

30 Фигура 28 представляет собой графики, на которых показана динамика уровня HMW для подбора буфера при 5°C (анализы №№ H04-150 B1) и RT (анализы №№ H04-163 A1, B1, B2 и H04-172 A1, A2), определенная с помощью SEC.

Фигура 29 представляет собой график, на котором показаны результаты DSC для подбора pH фосфатного/Tris-буфера (анализы №№ H04-187).

35 Фигура 30 представляет собой график, на котором показана динамика уровня HMW для подбора pH фосфатного/Tris-буфера, определенная с помощью SEC (анализы №№ H04-187).

Фигура 31 представляет собой график, на котором показаны результаты DSC для подбора концентрации буфера (анализы №№ H04-185).

40 Фигура 32 представляет собой графики, на которых показана динамика уровня HMW в зависимости от концентрации буфера при RT, определенная с помощью SEC (анализы №№ H04-185).

Фигура 33 представляет собой график, на котором показана динамика уровня HMW для NaCl при RT, определенная с помощью SEC (анализы №№ H04-185).

45 Фигура 34 представляет собой таблицу, в которой показана динамика уровня HMW для глицина в сравнении с сахарозой при RT, определенная с помощью SEC (анализы №№ H04-185).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение не ограничено конкретными методиками, протоколами,

линиями клеток, векторами или реагентами, описанными в данном документе, поскольку они могут варьировать без отступления от сущности и объема настоящего изобретения. Кроме того, терминология, используемая в данном документе, служит только для пояснения на примере конкретных вариантов осуществления и не предназначена для  
5 ограничения объема настоящего изобретения. Любой способ и материал, сходный с описанными в данном документе или эквивалентный им, можно применять при практическом осуществлении настоящего изобретения, и в данном документе описаны только иллюстративные способы, устройства и материалы.

Все патенты и публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки в целях описания и раскрытия  
10 белков, ферментов, векторов, клеток-хозяев и методик, описываемых в нем, которые можно применять вместе с настоящим изобретением и в его рамках. Однако, ничто в данном документе не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не имеет оснований для противопоставления такому раскрытию как более раннее  
15 изобретение.

#### А. Определения

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как и обычно понимаемое специалистом в данной области.

20 Здесь указано, что применяемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа также включают ссылку на множественное число, если в контексте прямо не указано иное.

Термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% (или 1%, или менее) от указанного значения или  
25 диапазона.

Термины "вводить" или "введение" относятся к акту инъекции или иной физической доставки вещества, находящегося вне организма (например, состава по настоящему изобретению), пациенту, как, например, посредством чресслизистой, внутрикожной, внутривенной, подкожной, внутримышечной доставки и/или любого другого способа  
30 физической доставки, описанного в данном документе или известного из уровня техники. Если осуществляют лечение заболевания или его симптома, то введение вещества, как правило, происходит после начала проявления заболевания или его симптомов. Если осуществляют предупреждение заболевания или его симптомов, то введение вещества, как правило, происходит до начала проявления заболевания или его симптомов.

35 Применительно к полипептиду термин "аналог" относится к полипептиду, обладающему функцией, сходной с или идентичной таковой у биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к IL-4/IL-13, но не обязательно содержащему  
40 аминокислотную последовательность, сходную с или идентичную таковой у биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к IL-4/IL-13, или обладающему структурой, сходной с или идентичной таковой у биспецифического  
45 полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к IL-4/IL-13. Полипептид, имеющий сходную аминокислотную последовательность, означает полипептид, удовлетворяющий по

меньшей мере одному из следующего: (а) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% и предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% или наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13 (например, SEQ ID NO: 1-5), фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к к IL-4/IL-13, описанных в данном документе; (б) полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая гибридизируется в жестких условиях с нуклеотидной последовательностью, кодирующей биспецифический полипептид, связывающийся с IL-4/IL-13, фрагмент биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифический эпитоп-связывающий фрагмент для IL-4/IL-13 или биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 (или его VH-, или VL-область), описанные в данном документе, имеющие по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 аминокислотных остатков или по меньшей мере 150 аминокислотных остатков (см., например, Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); и (с) полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% и предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% или наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99% идентичной нуклеотидной последовательности, кодирующей биспецифический полипептид, связывающийся с IL-4/IL-13, фрагмент биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифический эпитоп-связывающий фрагмент для IL-4/IL-13 или биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 (или его VH-, или VL-область), описанные в данном документе. Полипептид со структурой, сходной с таковой у биспецифического полипептидного антитела к IL-4/IL-13, фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к IL-4/IL-13, означает полипептид, имеющий вторичную, третичную или четвертичную структуру, сходную с таковой у биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, фрагмента биспецифического полипептида, связывающегося с IL-4/IL-13, биспецифического эпитоп-связывающего фрагмента для IL-4/IL-13 или биспецифического антитела к IL-4/IL-13. Структуру полипептида можно определить с помощью способов, известных специалистам в данной области, включающих, без ограничения, рентгеновскую

кристаллографию, ядерный магнитный резонанс и кристаллографическую электронную микроскопию.

Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, в первую аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты можно вводить гэпы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты).

Аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов затем сравнивают. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными по этому положению. Процентная идентичность двух последовательностей зависит от количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % идентичности = количество идентичных перекрывающихся положений/общее количество положений X 100%). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину.

Определение процентной идентичности двух последовательностей (например, аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновой кислоты) также можно осуществлять с помощью математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Карлина-Альтшуля, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264-2268, в модификации по Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873-5877. Этот алгоритм включен в состав программ NBLAST и XBLAST, описанных в Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215:403. Поиск нуклеотидных последовательностей в BLAST можно проводить с помощью программы поиска нуклеотидных последовательностей NBLAST с параметрами, установленными, например, для веса = 100, длины слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот, представляющих интерес. Поиск аминокислотных последовательностей в BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST с параметрами, установленными, например, для веса = 50, длины слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекуле белка, представляющей интерес. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения можно использовать BLAST с гэпами, описанный в Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Альтернативно, можно применять PSI-BLAST для выполнения итеративного поиска, выявляющего отдаленное родство между молекулами (Id.). При использовании программ BLAST, BLAST с гэпами и PSI-BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) в Интернете по адресу [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Миллера-Майерса, 1988, CABIOS 4:11-17. Этот алгоритм включен в состав программы ALIGN (версии 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения GCG для выравнивания последовательностей. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за продление гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4.

Процентную идентичность двух последовательностей можно определить с помощью

методик, сходных с описанными выше, допуская или не допуская гэпы. При расчете процентной идентичности обычно подсчитывают только точные совпадения.

"Антагонист" или "ингибитор" относится к молекуле, способной к ингибированию одного или нескольких видов биологической активности целевой молекулы, такого как передача сигнала с помощью IL-4 и/или IL-13. Антагонисты могут препятствовать связыванию рецептора с лигандом и наоборот путем ограничения способностей или уничтожения клеток, активируемых лигандом, и/или путем предотвращения активации рецептора или лиганда (например, активации тирозинкиназы) или передаче сигнала после связывания лиганда с рецептором. Антагонист может полностью блокировать взаимодействия рецептора и лиганда или может значительно ослаблять такие взаимодействия. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела к IL-4/IL-13 являются гуманизированными антагонистическими биспецифическими антителами к IL-4/IL-13, предпочтительно гуманизированными моноклональными антагонистическими биспецифическими антителами к IL-4/IL-13.

Термины "антитело", "иммуноглобулин" или "Ig" могут применяться в данном документе взаимозаменяемо. Термин "антитело" включает, без ограничения, синтетические антитела, моноклональные антитела, антитела, получаемые рекомбинантным путем, полиспецифические антитела (в том числе биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, внутриклеточные антитела, одноцепочечные Fv (scFv) (в том числе, например, моноспецифические, биспецифические и т.д.), камелизированные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, Fv с дисульфидными связями (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела и эпитоп-связывающие фрагменты любых из вышеуказанных объектов. В частности, антитела включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные части молекул иммуноглобулинов, т.е. антиген-связывающие домены или молекулы, содержащие антиген-связывающий участок, специфично связывающийся с антигеном IL-4 или IL-13 (например, одну или несколько областей, определяющих комплементарность (CDR), биспецифического антитела к IL-4/IL-13). Биспецифические антитела к IL-4/IL-13 могут принадлежать к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), любому классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или любому подклассу (например, IgG2a и IgG2b) молекул иммуноглобулинов. В предпочтительных вариантах осуществления биспецифические антитела к IL-4/IL-13 являются гуманизированными, такими как гуманизированные моноклональные биспецифические антитела к IL-4/IL-13. В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела к IL-4/IL-13 представляют собой антитела IgG, человеческие антитела IgG4.

Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способной к связыванию антителами по настоящему изобретению. Антиген может иметь один или более одного эпитопа. Примеры антигенов, распознаваемых антителами по настоящему изобретению, включают, без ограничения, сывороточные белки, например, цитокины, такие как IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, биологически активные пептиды, молекулы клеточной поверхности, например, рецепторы, переносчики, ионные каналы, вирусные и бактериальные белки.

Термин "антиген-связывающий участок" относится к части антитела, содержащей область, специфически связывающуюся с частью антигена или всем антигеном и комплементарную им. Если антиген является крупным, антитело может связываться только с определенной частью антигена, которая называется эпитопом. Антиген-связывающий домен может быть представлен в виде одного или нескольких

вариабельных доменов антитела. Антиген-связывающий домен предпочтительно образован соединением вариабельного домена легкой цепи антитела (VL) и вариабельного домена тяжелой цепи антитела (VH).

5 Термин "связывающее средство" относится к любой молекуле, такой как антитело, siRNA, нуклеиновая кислота, аптамер, белок или низкомолекулярное органическое соединение, связывающейся или специфически связывающейся с IL-4 и/или IL-13, или их вариантом, или фрагментом.

10 Термины "биспецифическое антитело" или "биспецифические антитела (BsAb)" относятся к молекулам, в которых антиген-связывающие участки двух антител объединены в одной молекуле. Таким образом, биспецифическое антитело способно связываться с двумя различными антигенами одновременно. Помимо путей применения в целях диагностики, BsAb создают предпосылки для новых путей применения в терапии посредством перенаправления сильных эффекторных систем на пораженные участки или посредством усиления нейтрализующих или стимулирующих видов активности антител. Биспецифические антитела могут быть моноклональными, но предпочтительно являются человеческими или гуманизированными. Способы получения биспецифических антител хорошо известны в данной области техники.

20 Термин "побочный продукт" включает нежелательные продукты, которые уменьшают или снижают относительное содержание терапевтического/профилактического связывающего средства, такого как антитело, в указанном составе. Например, типичные побочные продукты включают агрегаты антитела, фрагменты антитела, например, полученные вследствие распада антител путем дезамидирования или гидролиза, или их смеси. Как правило, агрегаты представляют собой комплексы, имеющие молекулярную массу, большую, чем у мономерного антитела. Продукты распада антител могут включать, например, фрагменты антитела, например, полученные в результате дезамидирования или гидролиза. Как правило, продукты распада представляют собой комплексы, имеющие молекулярную массу, меньшую, чем у мономерного антитела. В случае антитела IgG такие продукты распада имеют размер менее чем приблизительно 150 кДа.

30 Термины "композиция" и "состав" предназначены для охвата продукта, содержащего конкретные ингредиенты (например, биспецифическое антитело к IL-4/IL-13), необязательно в определенных количествах, а также любого продукта, прямо или косвенно образующегося в результате объединения определенных ингредиентов, необязательно в определенных количествах.

35 Термины "константная область" или "константный домен" относятся к карбоксиконцевой части легкой и тяжелой цепи, непосредственно не вовлеченной в связывание антитела с антигеном, но проявляющей различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором. Термины относятся к части молекулы иммуноглобулина, имеющей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, вариабельным доменом, которая содержит антиген-связывающий участок. Константный домен содержит домены СН1, СН2 и СН3 тяжелой цепи и домен СНL легкой цепи.

45 Термин "нарушение" относится к любому состоянию, лечение которого с помощью состава по настоящему изобретению будет иметь пользу. Он включает хронические и острые нарушения или заболевания, в том числе те патологические состояния, которые предрасполагают к развитию у млекопитающих, и в частности, у людей, рассматриваемого нарушения. Неограничивающие примеры нарушений, подлежащих лечению в данном документе, включают формы рака, воспаление, аутоиммунные

заболевания, инфекции, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания органов дыхания, неврологические заболевания и метаболические заболевания.

5 Термин "эпитоп" относится к ограниченной области на поверхности антигена, такого как полипептид IL-4 или IL-13, или фрагмент полипептида IL-4, или IL-13, способной к связыванию с одной или несколькими антиген-связывающими областями связывающего средства, такого как антитело, и обладающей антигенной или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно у млекопитающего и наиболее предпочтительно у человека, которая способна вызывать иммунный ответ. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой часть 10 полипептида, вызывающую образование антител у животного. Эпитоп, обладающий антигенной активностью, представляет собой часть полипептида, с которой специфически связывается антитело, что определяется с помощью любого способа, хорошо известного в данной области техники, например, такого, как иммунологический анализ. Эпитопы антигена не обязательно должны быть иммуногенными. Эпитопы 15 обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты и/или сахарные боковые цепи, и имеют конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Область полипептида, участвующая в образовании эпитопа, может представлять собой смежные аминокислоты полипептида, или эпитоп может быть образован двумя или более 20 несмежными областями полипептида. Эпитоп может представлять или не представлять собой трехмерный характерный поверхностный признак антигена. В определенных вариантах осуществления эпитоп IL-4 или IL-13 представляет собой трехмерный характерный поверхностный признак полипептида IL-4 или IL-13. В других вариантах осуществления эпитоп IL-4 или IL-13 представляет собой линейный характерный признак полипептида IL-4 или IL-13. Биспецифические антитела к IL-4/IL-13 могут специфически связываться с эпитопом денатурированной формы IL-4 или IL-13, эпитопом нативной формы IL-4 или IL-13 или как с денатурированной формой, так и с нативной формой IL-4 или IL-13.

Термин "наполнители" относится к инертным веществам, обычно применяемым в 30 качестве разбавителя, носителя, консерванта, связующего, стабилизатора и т.п. для лекарственных средств, и включает, без ограничений, белки (например, сывороточный альбумин и т.п.), аминокислоты (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, глицин, гистидин и т.п.), жирные кислоты и фосфолипиды (например, алкилсульфонаты, каприлат и т.п.), поверхностно-активные вещества 35 (например, SDS, полисорбат, неионогенное поверхностно-активное вещество и т.п.), сахараиды (например, сахарозу, мальтозу, трегалозу и т.п.) и полиолы (например, маннит, сорбит и т.п.). См. также Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, Pa., который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

40 Применительно к пептиду или полипептиду термин "фрагмент" относится к пептиду или полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность менее чем полной длины. Такой фрагмент может, например, быть получен в результате аминоконцевого усечения, карбоксиконцевого усечения и/или внутренней делеции остатка(остатков) в аминокислотной последовательности. Образование фрагментов может, например, быть обусловлено альтернативным сплайсингом РНК или протеазной активностью *in vivo*. В определенных вариантах осуществления фрагменты hIL-4 или hIL-13 включают в себя полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность из по меньшей мере 45 мере 5 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 10 смежных

аминокислотных остатков, по меньшей мере 15 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 20 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 40 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 70 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 80 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 90 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 125 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 175 смежных аминокислотных остатков, по меньшей мере 200 смежных аминокислотных остатков или по меньшей мере 250 смежных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности полипептида IL-4 или IL-13, или антитела, специфически связывающегося с полипептидом IL-4 или IL-13.

Фразы и термины "функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог" и т.п., а также их формы, по отношению к антителу или антигену означают соединение или молекулу, обладающие качественной биологической активностью наряду с антителом или антигеном полной длины, представляющими интерес. Например, функциональный фрагмент или аналог антитела к IL-4 может связываться с молекулой IL-4 или может препятствовать способности лиганда или агонистического или антагонистического антитела к связыванию с IL-4 или значительно ослаблять таковую.

Термин "тяжелая цепь", применяемый в отношении антитела, относится к пяти различным типам, называемым альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\Delta$ ), эpsilon ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), выделяемым на основании аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. Эти различные типы тяжелых цепей хорошо известны в данной области техники и служат основанием для выделения пяти классов антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включающих четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG1, IgG3 и IgG4. Тяжелая цепь предпочтительно представляет собой человеческую тяжелую цепь.

Термин "шарнир" или "шарнирный участок" относятся к гибкому полипептиду, содержащему аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела.

"Гуманизированные" формы отличных от человеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}'$ ,  $F_{(ab)2}$  или другие целевые связывающие подпоследовательности антител), которые содержат последовательности, полученные из иммуноглобулина, отличного от человеческого, в сравнении с человеческим антителом. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать один и чаще всего два переменных домена, практически во всех из которых все или практически все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине, отличном от человеческого, а все или практически все FR-области получены из матричной последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина ( $F_c$ ), обычно из выбранной матрицы на основе человеческого иммуноглобулина. Как правило, целью является получение молекулы антитела, обладающей минимальной иммуногенностью в организме человека. Таким образом, одну или несколько аминокислот в одной или нескольких CDR также можно заменить на менее иммуногенные для человека-хозяина без существенной минимизации функции специфического связывания одной или нескольких CDR с IL-4 и/или IL-13.

Альтернативно, FR может быть отличной от человеческой, но наиболее иммуногенные аминокислоты замещают менее иммуногенными. Тем не менее, пересадка CDR,

обсуждаемая выше, не является единственным способом получения гуманизованного антитела. Например, модификация только CDR-областей может быть недостаточной, поскольку в определении трехмерной структуры CDR-петель и общей аффинности антитела к своему лиганду нередко играют роль остатки каркасной области.

5 Следовательно, на практике можно применять любые средства, чтобы модифицировать исходную молекулу антитела, отличного от человеческого, делая ее менее иммуногенной для человека, и глобальная идентичность последовательностей с человеческим антителом не всегда является необходимой. Таким образом, гуманизацию также можно  
10 осуществлять, например, лишь путем замены всего нескольких остатков, в частности, находящихся на поверхности молекулы антитела и не погруженных внутрь молекулы, и, следовательно, не являющихся легкодоступными для иммунной системы хозяина. См., например, Studnicka et al., Prot Eng 7(6):805-814, 1994; Mol Imm 44:1986-1988, 2007; Sims et al., J Immunol 151:2296 (1993); Chothia et al., J Mol Biol 196:901 (1987); Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta et al., J Immunol 151:2623 (1993), WO 2006/  
15 042333 и патент США № 5869619. Альтернативно, антитела можно гуманизовать с помощью других методик, в том числе пересадки CDR (EPO 0 239 400; WO 91/09967 и патенты США №№ 5530101 и 5585089), венирования или изменения поверхности (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; и Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) и перетасовки цепей (патент  
20 США № 5565332). Человеческие антитела можно получать с помощью ряда способов, известных в данной области техники, включающих, без ограничения, способы фагового дисплея, см. патенты США №№ 4444887, 4716111, 5545806 и 5814318; а также WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, с использованием трансгенных животных, таких как грызуны, с использованием  
25 химерных клеток и т.д.

"Интерлейкин-4" (IL-4) относится к встречающимся в природе, или эндогенным, белкам IL-4 млекопитающих и к белкам, имеющим такую же аминокислотную последовательность, как и у соответствующих встречающихся в природе, или  
30 эндогенных, белков IL-4 млекопитающих (например, рекомбинантным белкам, синтетическим белкам (т.е. получаемым с помощью способов синтетической органической химии)). Соответственно, определенный в данном документе термин включает зрелый белок IL-4, полиморфные или аллельные варианты и другие изоформы IL-4, а также модифицированные или немодифицированные формы вышеупомянутых объектов (например, липидизированные, гликозилированные). Встречающиеся в природе  
35 или эндогенные IL-4, включают белки дикого типа, такие как зрелый IL-4, полиморфные или аллельные варианты и другие изоформы и мутантные формы, встречающиеся в природе у млекопитающих (например, у людей, у отличных от человека приматов). Такие белки можно, например, извлекать или выделять из источника, в естественных условиях вырабатывающего IL-4. Эти белки и белки, имеющие такую же  
40 аминокислотную последовательность, как и у соответствующих встречающихся в природе или эндогенных IL-4, называют по названию соответствующего млекопитающего. Например, если соответствующим млекопитающим является человек, то белок обозначают как человеческий IL-4. В данной области техники известно несколько мутантных белков IL-4, таких как раскрытые в WO 03/038041.

45 "Интерлейкин-13" (IL-13) относится к встречающимся в природе или эндогенным белкам IL-13 млекопитающих, и к белкам, имеющим такую же аминокислотную последовательность, как и у соответствующих встречающихся в природе или эндогенных белков IL-13 млекопитающих (например, рекомбинантным белкам, синтетическим

белкам (т.е. получаемым с помощью способов синтетической органической химии)). Соответственно, определенный в данном документе термин включает зрелый белок IL-13, полиморфные или аллельные варианты и другие изоформы IL-13 (например, получаемые посредством альтернативного сплайсинга или других клеточных процессов), а также модифицированные или немодифицированные формы вышеупомянутых объектов (например, липидизированные, гликозилированные). Встречающиеся в природе или эндогенные IL-13, включают в себя белки дикого типа, такие как зрелый IL-13, полиморфные или аллельные варианты и другие изоформы и мутантные формы, встречающиеся в природе у млекопитающих (например, у людей, у отличных от человека приматов). Например, как используется в данном документе, IL-13 охватывает вариант человеческого IL-13, ассоциированный с астмой (атопической и неатопической астмой), в котором Arg в положении 110 зрелого человеческого IL-13 замещен Gln (положение 110 зрелого IL-13 соответствует положению 130 белка-предшественника), и другие варианты IL-13 (Heinzmann et al, Hum Mol Genet. 9:549-559 (2000)). Такие белки можно, например, извлекать или выделять из источника, в естественных условиях вырабатывающего IL-13. Эти белки и белки, имеющие такую же аминокислотную последовательность, как и у соответствующих встречающихся в природе или эндогенных IL-13, называют по названию соответствующего млекопитающего. Например, если соответствующим млекопитающим является человек, то белок обозначают как человеческий IL-13. В данной области техники известно несколько мутантных белков IL-13, таких как раскрытые в WO 03/035847.

"Выделенное" или "очищенное" связывающее средство, такое как антитело, практически не содержит клеточный материал или других загрязняющих белков из клеточного или тканевого источника, из которого получено связывающее средство, или практически не содержит химических предшественников или других химических веществ в случае получения путем химического синтеза. Например, выражение "практически не содержит клеточный материал" включает препараты антител, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или получено рекомбинантным путем. Таким образом, антитело, практически не содержащее клеточный материал, включает препараты антитела, имеющие менее чем приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) гетерологичного белка (также называемого в данном документе "загрязняющим белком"). Если антитело получено рекомбинантным путем, то оно также предпочтительно практически не содержит культуральную среду, т.е. культуральная среда представляет менее чем приблизительно 20%, 10% или 5% от объема белкового препарата. Если антитело получено путем химического синтеза, то оно предпочтительно практически не содержит химических предшественников или других химических веществ, т.е. оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, участвующих в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее чем приблизительно 30%, 20%, 10%, 5% (по сухому весу) химических предшественников или соединений, отличных от антитела, представляющего интерес. В предпочтительном варианте осуществления биспецифические антитела к IL-4/IL-13 являются выделенными или очищенными.

Термин "нумерация по Кабат" и подобные термины приняты в данной области техники и относятся к системе нумерации аминокислотных остатков, являющихся более переменными (т.е. гиперпеременными), чем другие аминокислотные остатки в переменных областях тяжелой и легкой цепей антитела или его антиген-связывающей части (Kabat *et al.* (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 и Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services,

публикация НИИ № 91-3242). В случае вариабельной области тяжелой цепи гипервариабельная область обычно находится в пределах положений аминокислот 31-35 для CDR1, положений аминокислот 50-65 для CDR2 и положений аминокислот 95-102 для CDR3. В случае вариабельной области легкой цепи гипервариабельная область  
5 обычно находится в пределах положений аминокислот 24-34 для CDR1, положений аминокислот 50-56 для CDR2 и положений аминокислот 89-97 для CDR3.

Термин "легкая цепь", применяемый в отношении антитела, относится к двум различным типам, называемым каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ), выделяемым на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотные  
10 последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления легкая цепь представляет собой человеческую легкую цепь.

Термин "линкер" относится к молекуле, соединяющей антиген-связывающие домены антитела. Линкер может представлять собой линкерную молекулу любого вида. Линкер  
15 предпочтительно представляет собой полипептид. Линкеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга в пределах полипептидной тяжелой цепи и полипептидной легкой цепи и между ними. Кроме того, линкер может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. Предпочтительное пептидное линкерное звено для доменов тяжелой цепи, как и в случае доменов легкой цепи,  
20 представляет собой  $(G4S)_2$ , т.е. GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6). Количество линкерных звеньев в тяжелой цепи и в легкой цепи могут быть одинаковыми (симметричный порядок) или отличаться друг от друга (асимметричный порядок). Пептидный линкер предпочтительно является достаточно длинным для обеспечения надлежащей степени гибкости для предотвращения препятствования антиген-связывающими компонентами  
25 активности друг друга, например, в результате стерического несоответствия, для обеспечения правильного сворачивания белка и, при необходимости, для предоставления молекулам антитела возможности взаимодействия с двумя или более, возможно, расположенными на большом расстоянии друг от друга, рецепторами на поверхности одной и той же клетки; еще он предпочтительно является достаточно коротким для  
30 предоставления компонентам антитела возможности сохранения стабильности в клетке. Таким образом, специалист в данной области может без труда выбрать длину, состав и/или конформацию пептидных линкеров в целях оптимизации желаемых свойств поливалентного антитела.

Термины "низкое содержание солей" и "низкая концентрация солей" означают  
35 относительно низкую концентрацию солей, составляющую 15 мМ или менее, в том числе концентрацию солей 0 или отсутствие солей. Концентрацию солей определяют по количеству солей и буферов в составе. Предпочтительно, чтобы буферная система присутствовала в составах в низкой концентрации, т.е. приблизительно 15 мМ или менее, в целях снижения ионной силы составов. Альтернативно, в некоторых  
40 предпочтительных вариантах осуществления не содержатся соли и не содержатся буферы. Также предпочтительно, чтобы к составам не добавляли дополнительных солей, таких как NaCl, в целях поддержания как можно более низкой ионной силы составов.

Термины "контролировать", "контролирующий" и "контроль" относятся к  
45 благоприятным эффектам, которые субъект получает от средства терапии (например, профилактическим или терапевтическим средством), которое не приводит в результате к излечению от инфекции. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят одно или несколько средств терапии (например, профилактических или терапевтических

средств, таких как состав по настоящему изобретению) для "контроля" заболевания, опосредованного IL-4 или IL-13 (например, форм рака, воспаления, аутоиммунных заболеваний, инфекций, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний органов дыхания, неврологических заболеваний и метаболических заболеваний), одного или  
5 нескольких его симптомов, чтобы предупредить прогрессирование или ухудшение течения заболевания.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из популяции однородных или практически однородных антител, и каждое моноклональное антитело, как правило, будет распознавать один эпитоп на поверхности антигена. В  
10 предпочтительных вариантах осуществления "моноклональное антитело" представляет собой антитело, вырабатываемое одной гибридомой или другой клеткой. Термин "моноклональный" не ограничен каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела можно получать с помощью гибридного  
15 способа, описанного в Kohler *et al.*; Nature, 256:495 (1975), или можно выделять из фаговых библиотек. Другие способы получения клональных линий клеток и моноклональных антител, экспрессируемых в них, хорошо известны в данной области техники (см., например, Chapter 11 в Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.; Ausubel *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York).

Термин "фармацевтическая композиция", применяемый в настоящем изобретении,  
20 относится к составам различных препаратов. Составы, содержащие терапевтически эффективные количества антител, представляют собой стерильные жидкие растворы, жидкие суспензии или лиофилизированные варианты и необязательно содержат стабилизаторы или наполнители.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным органом  
25 федерального правительства или правительства штата или описанный в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей.

Под "фармацевтически приемлемым наполнителем" понимают любое инертное  
30 вещество, объединяемое с активной молекулой, такой как моноклональное антитело, для получения подходящей или удобной лекарственной формы. "Фармацевтически приемлемый наполнитель" представляет собой наполнитель, являющийся нетоксичным для получающих его пациентов в используемых дозировках и концентрациях и являющийся совместимым с другими ингредиентами состава, содержащего моноклональное антитело.

35 Термины "предупреждать", "предупреждающий" и "предупреждение" относятся к полному или частичному подавлению развития, рецидива, проявления или распространения заболевания, опосредованного IL-4 или IL-13, и/или симптома, связанного с ним, в результате введения средства терапии или комбинации средств  
40 профилактики или терапевтических средств, таких как состав по настоящему изобретению).

Термин "профилактическое средство" относится к любому средству, которое может  
45 полностью или частично подавить развитие, рецидив, проявление или распространение заболевания, опосредованного IL-4 или IL-13, и/или симптома, связанного с ним, у субъекта. В определенных вариантах осуществления термин "профилактическое средство" относится к составу по настоящему изобретению. В определенных других вариантах осуществления термин "профилактическое средство" относится к средству, отличному от состава по настоящему изобретению. Профилактическое средство

предпочтительно представляет собой средство, о котором известно, что оно является применимым, либо применялось, либо применяется в настоящее время для предупреждения заболевания, опосредованного IL-4 или IL-13, и/или симптома, связанного с ним, или препятствования проявлению, развитию, прогрессированию и/или отягощению заболевания, опосредованного IL-4 или IL-13, и/или симптома, связанного с ним. В конкретных вариантах осуществления профилактическое средство представляет собой гуманизированное биспецифическое антитело к IL-4/IL-13.

Фраза "рекомбинантное антитело" включает антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые рекомбинантным путем, такие как антитела, экспрессируемые с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина, антитела, выделяемые из комбинаторной библиотеки рекомбинантных человеческих антител, антитела, выделяемые из животного (например, мыши или коровы), которое является трансгенным и/или трансхромосомным по генам человеческих иммуноглобулинов (см., например, Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295), или антитела, получаемые, экспрессируемые, создаваемые или выделяемые любым другим способом, включающим соединение последовательностей генов человеческих иммуноглобулинов с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела могут иметь переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов (см. Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, публикация NIH № 91-3242). В определенных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если применяют животное, трансгенное по последовательностям человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*), и поэтому аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, будучи полученными из последовательностей VH и VL зародышевого типа и родственными им, в естественных условиях могут не существовать в наборе антител зародышевого типа *in vivo*.

Термин "сахарид" относится к классу молекул, являющихся производными многоатомных спиртов. Сахариды обычно называются углеводами и могут содержать сахарные (сахаридные) звенья в различных количествах, например, в случае моносахаридов, дисахаридов и полисахаридов.

Термины "специфически связывается" или "специфическое связывание" означают специфическое связывание с антигеном или его фрагментом и отсутствие специфического связывания с другими антигенами. Например, антитело, специфически связывающееся с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами с более низкой аффинностью, определяемой, например, с помощью радиоиммунологических анализов (RIA), твердофазных иммуноферментных анализов (ELISA), анализов на VIACORE или других анализов, известных в данной области техники. Антитела или их варианты, или фрагменты, специфически связывающиеся с антигеном, могут проявлять перекрестную реактивность с родственными антигенами. Антитела или их варианты, или фрагменты, специфически связывающиеся с антигеном, предпочтительно не реагируют перекрестно с другими антигенами. Антитело или его вариант, или фрагмент, специфически связывающиеся с антигеном IL-4 и/или IL-13, можно идентифицировать, например, с помощью иммунологических анализов, анализов на VIACORE или других методик, известных специалистам в данной области. Интенсивность специфической или избирательной реакции в типичном случае будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум и в более типичном случае более чем в 10 раз

превышать фоновый уровень. См., например, Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York, на страницах 332-336 в отношении обсуждения специфичности антител.

"Стабильный" или "стабилизированный" состав представляет собой состав, в котором связывающее средство, такое как антитело, находящееся в нем, по сути сохраняет его физическую стабильность, идентичность, целостность, и/или химическую стабильность, идентичность, целостность, и/или биологическую активность при хранении. Различные аналитические методики для измерения стабильности белков доступны в данной области техники и рассматриваются, например, в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Стабильность можно измерять при определенной температуре и других условиях хранения в течение определенного периода времени. Стабильность можно определять с помощью по меньшей мере одного из способов, выбранных из группы, состоящей из визуального осмотра, SDS-PAGE, IEF, HPSEC, RFFIT и ELISA каппа/лямбда-цепей. Например, антитело "сохраняет свою физическую стабильность" в фармацевтическом составе, если оно не проявляет признаков агрегации, осаждения и/или денатурации после визуального исследования цвета и/или прозрачности или согласно измерениям с помощью рассеяния UV-света, SDS-PAGE или с помощью эксклюзионной хроматографии (высокого давления) (HPSEC). При применении составов по настоящему изобретению предпочтительно 5% или менее, обычно 4% или менее, предпочтительно 3% или менее, более предпочтительно 2% или менее и, в частности, 1% или менее антител образуют агрегаты согласно измерениям с помощью HPSEC или любого другого подходящего способа измерения образования агрегатов. Например, антитело считается стабильным в конкретном составе, если мономерное антитело имеет чистоту, составляющую приблизительно 90%, предпочтительно приблизительно 95%, в частности, приблизительно 98%, после определенного заданного периода времени при определенных условиях хранения в конкретном составе. Химическую стабильность можно оценить путем выявления и количественного определения химически измененных форм белка. Химическое изменение может включать модификацию размера (например, усечение), которую можно оценить, например, с помощью (HP)SEC, SDS-PAGE и/или матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации/времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают изменение заряда (например, происходящее в результате дезамидирования), которое можно оценить, например, с помощью ионообменной хроматографии. Антитело "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтическом составе в определенный момент времени, если биологическая активность антитела в определенный момент времени составляет по меньшей мере приблизительно 90% (в пределах ошибок анализа) от биологической активности, проявляемой в момент получения фармацевтического состава, что определяется, например, в анализе связывания антигена или анализе нейтрализации вируса.

Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо. Как используется в данном документе, субъект предпочтительно является млекопитающим, таким как млекопитающее, отличное от примата (например, коровы, свиньи, лошади, кошки, собаки, крысы и т.п.), или примат (например, обезьяна и человек), наиболее предпочтительно человек. В одном варианте осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком, имеющим заболевание, опосредованное IL-4 и/или IL-13. В другом варианте осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком, имеющим риск развития заболевания, опосредованного

IL-4 и/или IL-13.

Фраза "практически идентичный" по отношению к полипептидной последовательности цепи антитела может быть истолкована как цепь антитела, обладающая по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95% или большей идентичностью последовательности с эталонной полипептидной последовательностью. Данный термин по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты может быть истолкован как последовательность нуклеотидов, обладающая по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95%, или 97%, или большей идентичностью последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты.

У вариантов "с заменами" по меньшей мере один аминокислотный остаток в нативной последовательности удален и замещен другой аминокислотой, вставленной на его место в то же самое положение. Замены могут быть одиночными, при которых в молекуле заменена только одна аминокислота, или могут быть многократными, при которых в одной и той же молекуле заменены две или более аминокислоты. Множественные замены могут иметь место в сайтах, расположенных друг за другом. Также одна аминокислота может быть замещена множеством остатков, и в этом случае такой вариант содержит как замену, так и вставку. У вариантов "со вставками" одна или несколько аминокислот вставлены непосредственно прилегающими к аминокислоте в конкретном положении в нативной последовательности. Непосредственно прилегающий к аминокислоте означает соединенный с функциональной  $\alpha$ -карбоксильной или  $\alpha$ -аминогруппой аминокислоты. У вариантов "с делециями" одна или несколько аминокислот в нативной аминокислотной последовательности удалены. Обычно у вариантов с делециями удалены одна или две аминокислоты в конкретной области молекулы.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству средства терапии (например, состава по настоящему изобретению), достаточного для снижения и/или уменьшения тяжести и/или продолжительности указанного заболевания и/или симптома, связанного с ним. Данный термин также охватывает количество, необходимое для ослабления или уменьшения интенсивности хода или прогрессирования указанного заболевания, ослабления или уменьшения интенсивности рецидива, развития или проявления указанного заболевания и/или для улучшения или усиления профилактического(профилактических) или терапевтического(терапевтических) эффекта (эффектов) другого средства терапии (например, средства терапии, отличного от состава по настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество антитела по настоящему изобретению обеспечивает местную концентрацию, составляющую приблизительно 5-20 нг/мл и предпочтительно приблизительно 10-20 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, также относится к количеству антитела по настоящему изобретению для достижения определенного результата (например, ингибирования цитокина IL-4 и/или IL-13).

Термин "терапевтическое средство" относится к любому средству, которое можно применять в лечении, контроле или уменьшении интенсивности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13, и/или симптома, связанного с ним. В определенных вариантах осуществления термин "терапевтическое средство" относится к составу по настоящему изобретению. В определенных других вариантах осуществления термин "терапевтическое средство" относится к средству, отличному от состава по настоящему изобретению. Терапевтическое средство предпочтительно представляет собой средство, о котором известно, что оно является применимым, либо применялось, либо применяется

в настоящее время для лечения, контроля или уменьшения интенсивности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13, или одного или нескольких симптомов, связанных с ним.

5 Термин "терапия" относится к любому протоколу, способу и/или средству, которые можно применять в предупреждении, контроле, лечении и/или уменьшении интенсивности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13 (например, форм рака, воспаления, аутоиммунных заболеваний, инфекций, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний органов дыхания, неврологических заболеваний и метаболических заболеваний). В определенных вариантах осуществления термины "виды терапии" и  
10 "терапия" относятся к биологической терапии, поддерживающей терапии и/или другим видам терапии, применимым в предупреждении, контроле, лечении и/или уменьшении интенсивности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13, известного специалистам в данной области, таким как медицинский персонал.

Термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к снижению или уменьшению  
15 прогрессирования, тяжести и/или продолжительности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13 (например, форм рака, воспаления, аутоиммунных заболеваний, инфекций, сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний органов дыхания, неврологических заболеваний и метаболических заболеваний), в результате введения одного или нескольких средств терапии (в том числе, без ограничения, введения одного  
20 или нескольких профилактических или терапевтических средств, таких как состав по настоящему изобретению).

Термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" относятся к частям легкой и тяжелой цепей, обычно содержащим приблизительно 120-130 аминоконцевых  
25 аминокислот в тяжелой цепи и приблизительно 100-110 аминокислот в легкой цепи, которые значительно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и определении специфичности каждого конкретного антитела к своему конкретному антигену. В этих областях, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR), сосредоточена вариабельность последовательностей, при этом более высококонсервативные области вариабельного домена называют  
30 каркасными областями (FR). CDR легкой и тяжелой цепей несут основную ответственность за взаимодействие антитела с антигеном. Нумерация положений аминокислот приводится в соответствии с EU-индексом согласно Kabat *et al.* (1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5<sup>th</sup> ed. ("Кабат и соавт."). В предпочтительных вариантах осуществления  
35 вариабельная область представляет собой человеческую вариабельную область.

#### В. Составы и компоненты составов

Как было указано выше, составы по настоящему изобретению содержат биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 и буферную систему, где pH состава составляет  
40 приблизительно pH 7, и где состав характеризуется низкой концентрацией солей в целях снижения ионной силы состава. Составы необязательно могут дополнительно содержать неионогенное поверхностно-активное вещество, сахар и/или неионогенный стабилизатор. Было выявлено, что в составах по настоящему изобретению предусмотрены значительные улучшения по сравнению с более ранними составами на основе биспецифических антител к IL-4/IL-13, в которых повышение концентрации антитела  
45 в составе часто приводит к образованию молекулярных агрегатов антитела и образованию видимых и не видимых невооруженным глазом частиц. В частности, составы по настоящему изобретению проявляют хорошую стабильность в отношении видимых частиц, не видимых невооруженным глазом частиц, низкомолекулярных

белков и высокомолекулярных белков.

I. Биспецифические антитела к IL-4/IL-13 и их варианты и фрагменты

В определенных вариантах осуществления составы по настоящему изобретению содержат биспецифическое антитело к IL-4/IL-13. Биспецифическое антитело или его варианты, или фрагменты связываются или специфически связываются с IL-4 и/или IL-13. Молекулы IL-4 и/или IL-13 могут быть получены от любого вида. Молекулы IL-4 и/или IL-13 предпочтительно получены от человека. Аминокислотные последовательности и структуры белков как IL-4, так и IL-13 хорошо известны в данной области техники.

В определенных иллюстративных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 представляет собой гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело или его вариант, или антиген-связывающий фрагмент. Предпочтительные биспецифические антитела к IL-4/IL-13 предотвращают связывание IL-4 и IL-13 со своими рецепторами и ингибируют биологическую активность IL-4 и IL-13.

В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи (VL), связывающуюся с IL-13, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны CDR; CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 7, RASESVD SYGQSYMHWY; CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 8, LASNLES; а CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 9, QQNAEDSRT).

VL3 антитела hB-B13 к IL-13 (SEQ ID NO: 1)

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCR**RASESVD SYGQSYMHWY** QQKAGQPPKL  
LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVQAEDAATY YC**QQNAEDSR**  
**TFGGG**TKLEI K

В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), связывающуюся с IL-13, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны CDR; CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 10, GFSLTDSSIN; CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 11, DGRID; а CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 12, DGYFPYAMDF).

VH2 антитела hB-B13 к IL-13 (SEQ ID NO: 2)

EVQLKESGPG LVAPGGSLSI TCTVSG**GFSLT DSSIN**WVRQP PGKGLEWLGM  
IWG**DGRIDYA** DALKSRLSIS KDSSKSQVFL EMTSLRTDDT ATYYCARD**GY**  
**FPYAMDF**WGQ GTSVTVSS

В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи (VL), связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны CDR; CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 13, HASQNIDVWLS; CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 14, KASNLHTG; CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 15, QQANSYPFT).

VL1 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTCHASQ**NI**D VWLSWFQQKP GNIPKLLIYK  
**ASNLHTG**VPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYC**QQ** **AHSYPET**FGG  
 GTKLEIKR

В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны CDR; CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 16, GYSFTSYWIH; CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 17, IDPSDGETR; а CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 18, LKEYGNYDSFYFDV).

VH1 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 4)

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM  
**IDPSDGETRL** NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYY**CTRLK**  
**EYGNYDSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

В другом конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (Подчеркиванием показаны произведенные аминокислотные замены. Жирным шрифтом показаны CDR; CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 19, GYSFTSYWIH; CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 20, IDASDGETR; а CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 21, LKEYGNYDSFYFDV).

VH2 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 5)

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKAS**GYSFT** **SYWIHWIKQR** PGQGLEWIGM  
**IDASDGETRL** NQRFQGRATL TVDESTSTAY MQLRSPTSED SAVYY**CTRLK**  
**EYGNYDSFYF** DVWGAGTLVT VSSA

В некоторых конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, связывающуюся с IL-13, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и вариабельную область легкой цепи, связывающуюся с IL-13, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В других конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и вариабельную область легкой цепи, связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В еще нескольких других конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, связывающуюся с IL-4, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В более конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4 или 2 и 5; и вариабельную область легкой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3.

В наиболее конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 содержит переменную область тяжелой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4; и переменную область легкой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая  
5 содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3 ("лидерное антитело"). Схематическое изображение варианта осуществления биспецифического антитела к IL-4/IL-13 показано на фигуре 1, а иллюстративные переменные области тяжелой и легкой цепей показаны на фигуре 2. Молекулярная масса лидерного антитела, определенная с помощью масс-спектрометрии, составляет 198 кДа. Изоэлектрическая  
10 точка лидерного антитела, определенная с помощью изоэлектрического фокусирования, варьирует в диапазоне от 5,8 до 6,2.

В альтернативных наиболее конкретных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат легкую цепь формулы VL1-линкер-VL2 и тяжелую цепь формулы VH1-линкер-VH2, где VL1 и VH1  
15 образуют антиген-связывающий домен для IL-4, а VL2 и VH2 образуют антиген-связывающий домен для IL-13. В некоторых вариантах осуществления VL1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 1; VH1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 2; VL2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 3; а VH2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 4 или 5. В альтернативных вариантах  
20 осуществления VL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; VL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; а VH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент содержат линкер между антиген-связывающими доменами антитела. Линкер может представлять собой линкерную молекулу любого  
25 вида. Линкер предпочтительно представляет собой полипептид. Линкеры могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга в пределах полипептидной тяжелой цепи и полипептидной легкой цепи и между ними. Кроме того, линкер может иметь длину 1,  
30 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Предпочтительное пептидное линкерное звено для доменов тяжелой цепи, как и в случае доменов легкой цепи, представляет собой  $(G4S)_2$ , т.е. GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 6).

Наиболее предпочтительно SEQ ID NO: 2 и 4 соединены первым пептидным линкером, а SEQ ID NO: 1 и 3 соединены вторым пептидом, где каждый из первого и второго  
35 пептидных линкеров содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Количества линкерных звеньев в тяжелой цепи и в легкой цепи могут быть одинаковыми (симметричный порядок) или отличаться друг от друга (асимметричный порядок).

Пептидный линкер предпочтительно является достаточно длинным для обеспечения надлежащей степени гибкости для предотвращения препятствования антиген-  
40 связывающими компонентами активности друг друга, например, в результате стерического несоответствия, для обеспечения правильного сворачивания белка и, при необходимости, для предоставления молекулам антитела возможности взаимодействия с двумя или более, возможно, расположенными на большом расстоянии друг от друга, рецепторами на поверхности одной и той же клетки; еще он предпочтительно является  
45 достаточно коротким для предоставления компонентам антитела возможности сохранения стабильности в клетке. Таким образом, специалист в данной области может без труда выбрать длину, состав и/или конформацию пептидных линкеров в целях оптимизации желаемых свойств поливалентного антитела.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент представляют собой гуманизованное антитело. Примеры изотипов гуманизованных антител включают IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 предпочтительно представляет собой антитело IgG. Существуют четыре формы IgG. Биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 предпочтительно представляет собой антитело IgG4. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 представляет собой гуманизованное антитело IgG4.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент дополнительно содержат константную область, например, CH1, CH2, CH3 и CL.

Определенные варианты осуществления составов по настоящему изобретению также включают варианты биспецифических антител к IL-4/IL-13 или их антиген-связывающих фрагментов. Варианты биспецифических антител к IL-4/IL-13 могут обладать сходными физико-химическими свойствами на основании их высокого подобия и, таким образом, также включены в объем настоящего изобретения. Варианты определены как антитела с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 95%, предпочтительно по меньшей мере на 97%, например, по меньшей мере на 98% или 99% гомологична последовательности биспецифических антител к IL-4/IL-13, способные к конкуренции за связывание с полипептидом IL-4 и/или IL-13, фрагментом полипептида IL-4 и/или IL-13, или эпитопом IL-4, и/или IL-13. Варианты предпочтительно будут уменьшать, нейтрализовать или иным образом ингибировать биологическую активность IL-4 и/или IL-13. Определение конкуренции за связывание с мишенью можно выполнять обычными способами, известными специалисту в данной области. Варианты предпочтительно представляют собой человеческие или гуманизованные антитела и предпочтительно представляют собой молекулы IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления вариант обладает по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи, связывающейся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 4 и 5; и вариабельной областью легкой цепи, связывающейся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3. Термин "вариант" относится к антителу, содержащему аминокислотную последовательность, в которой одна или несколько аминокислот изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями биспецифического антитела к IL-4/IL-13. Вариант может иметь консервативные модификации последовательности, в том числе аминокислотные замены, модификации, добавления и делеции.

Примеры модификаций включают, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, пегилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление и образование связи с клеточным лигандом или другим белком. Аминокислотные модификации можно внедрять в нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез, молекулярное клонирование, направленный мутагенез с использованием олигонуклеотидов и случайный ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают те, при которых аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, имеющим сходные структурные или

химические свойства. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан). Специалисту в данной области будет очевидно, что можно также применять классификации семейств аминокислотных остатков, отличные от применяемой выше. Кроме того, вариант может иметь неконсервативные аминокислотные замены, например, замещение аминокислоты аминокислотным остатком, имеющим другие структурные или химические свойства. Сходные незначительные изменения могут также включать аминокислотные делеции или вставки, или обе эти категории. Руководство по определению того, какие аминокислотные остатки могут быть заменены, модифицированы, вставлены или удалены без прекращения иммунной активности, может быть найдено при помощи компьютерных программ, хорошо известных в данной области техники. Компьютерные алгоритмы, такие как, среди прочего, Gap или Bestfit, известные специалисту в данной области, можно применять для оптимального выравнивания аминокислотных последовательностей, подлежащих сравнению, и для определения сходных или идентичных аминокислотных остатков. Варианты могут обладать такими же или другими, более высокими либо более низкими, значениями аффинности связывания по сравнению с биспецифическим антителом к IL-4/IL-13, но по-прежнему способны к специфическому связыванию с IL-4 и/или IL-13 и могут обладать такой же, более высокой или более низкой биологической активностью по сравнению с биспецифическим антителом к IL-4/IL-13.

Варианты осуществления настоящего изобретения также включают антиген-связывающие фрагменты биспецифических антител к IL-4/IL-13. Термины "антиген-связывающий домен", "антиген-связывающая область", "антиген-связывающий фрагмент" и подобные термины относятся к части антитела (например, к областям, определяющим комплементарность (CDR)), содержащей аминокислотные остатки, взаимодействующие с антигеном и придающие связывающему средству его специфичность и аффинность к антигену. Антиген-связывающая область может быть получена от любых видов животных, таких как грызуны (например, кролик, крыса или хомяк) и люди. Антиген-связывающая область предпочтительно будет происходить от человека. Неограничивающие примеры антиген-связывающих фрагментов включают Fab-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, одноцепочечные молекулы Fv (scFv), dAb-фрагменты и минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 (или его вариант, или его антиген-связывающий фрагмент) будет уменьшать, нейтрализовать или иным образом ингибировать биологическую активность IL-4 и/или IL-13 *in vivo*.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифические антитела к IL-4/IL-13 (или их варианты, или их антиген-связывающие фрагменты) являются антагонистическими антителами, уменьшающими, нейтрализующими или иным образом ингибирующими биологическую активность IL-4

и/или IL-13 *in vivo*.

Идентификация, выделение, получение и определение характеристик биспецифических антител к IL-4/IL-13 или их вариантов, или фрагментов, связывающихся как с IL-13, так и с IL-4, в том числе биспецифического антитела к IL-4/IL-13, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, были подробно описаны в публикации по PCT WO 2009/052081, включенной в данный документ посредством ссылки.

Биспецифические антитела к IL-4/IL-13 (или их варианты, или их антиген-связывающие фрагменты) предпочтительно присутствуют в составах в количестве от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, например, от приблизительно 50 мг/мл до приблизительно 150 мг/мл, от приблизительно 75 мг/мл до приблизительно 125 мг/мл и приблизительно 100 мг/мл. Альтернативно, биспецифические антитела к IL-4/IL-13 (или их варианты, или их антиген-связывающие фрагменты) присутствуют в составах в количестве от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 65 мг/мл, от приблизительно 66 мг/мл до приблизительно 130 мг/мл, от приблизительно 131 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл. Например, биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 может присутствовать в составе в количестве приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл, приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл, приблизительно 50 мг/мл, приблизительно 55 мг/мл, приблизительно 60 мг/мл, приблизительно 65 мг/мл, приблизительно 70 мг/мл, приблизительно 75 мг/мл, приблизительно 80 мг/мл, приблизительно 85 мг/мл, приблизительно 90 мг/мл, приблизительно 95 мг/мл, приблизительно 100 мг/мл, приблизительно 105 мг/мл, приблизительно 110 мг/мл, приблизительно 115 мг/мл, приблизительно 120 мг/мл, приблизительно 125 мг/мл, приблизительно 130 мг/мл, приблизительно 135 мг/мл, приблизительно 140 мг/мл, приблизительно 145 мг/мл, приблизительно 150 мг/мл, приблизительно 155 мг/мл, приблизительно 160 мг/мл, приблизительно 165 мг/мл, приблизительно 170 мг/мл, приблизительно 175 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл, приблизительно 185 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 195 мг/мл или приблизительно 200 мг/мл.

В определенных иллюстративных вариантах осуществления биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 присутствует в составе в количестве приблизительно 100 мг/мл. В другом иллюстративном варианте осуществления гуманизированное биспецифическое антитело IgG4 к IL-4/IL-13, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4 или 2 и 5; и вариабельную область легкой цепи, связывающуюся как с IL-13, так и с IL-4, которая содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, присутствует в составе в количестве приблизительно 100 мг/мл.

## II. Буферные средства, буферные системы, ионная сила и рН

Буферные средства способствуют поддержанию рН составов в диапазоне, близком к физиологическим условиям. Буферы предпочтительно присутствуют в составах в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ. Подходящие буферные средства для применения в настоящем изобретении включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, такие как цитратные буферы (например, смесь цитрата мононатрия и цитрата динатрия, смесь лимонной кислоты и цитрата тринатрия, смесь лимонной кислоты и цитрата мононатрия

и т.п.), сукцинатные буферы (например, смесь янтарной кислоты и сукцината  
мононатрия, смесь янтарной кислоты и гидроксида натрия, смесь янтарной кислоты и  
сукцината динатрия и т.п.), тартратные буферы (например, смесь винной кислоты и  
тартрата натрия, смесь винной кислоты и тартрата калия, смесь винной кислоты и  
5 гидроксида натрия и т.п.), фумаратные буферы (например, смесь фумаровой кислоты  
и фумарата мононатрия, смесь фумаровой кислоты и фумарата динатрия, смесь  
фумарата мононатрия и фумарата динатрия и т.п.), глюконатные буферы (например,  
смесь глюконовой кислоты и глюконата натрия, смесь глюконовой кислоты и  
гидроксида натрия, смесь глюконовой кислоты и глюконата калия и т.п.), оксалатные  
10 буферы (например, смесь щавелевой кислоты и оксалата натрия, смесь щавелевой  
кислоты и гидроксида натрия, смесь щавелевой кислоты и оксалата калия и т.п.),  
лактатные буферы (например, смесь молочной кислоты и лактата натрия, смесь  
молочной кислоты и гидроксида натрия, смесь молочной кислоты и лактата калия и  
т.п.) и ацетатные буферы (например, смесь уксусной кислоты и ацетата натрия, смесь  
15 уксусной кислоты и гидроксида натрия и т.п.). Также являются подходящими и могут  
применяться фосфатные буферы, карбонатные буферы, гистидиновые буферы, соли  
триметиламина, такие как Tris, HEPES и другие такие известные буферы. В составах по  
настоящему изобретению предпочтительно применяют комбинацию буферов, т.е. два  
или более буферных средства. Комбинацию двух или более буферов в данном документе  
20 называют буферной системой.

Составы по настоящему изобретению содержат буферную систему. Буферная система  
поддерживает рН, подходящий с физиологической точки зрения. В дополнение, буферная  
система участвует в обеспечении изотоничности и химической стабильности состава.  
Ввиду сложности разработки стабильного состава на основе антитела для  
25 биспецифического антитела предпочтительным является применение комбинированной  
буферной системы с целью получения преимуществ от благоприятных эффектов двух  
или более буферов. Путем сочетания благоприятных эффектов двух или более буферов  
можно разработать более стабильный состав на основе антитела.

Буферная система предпочтительно присутствует в составах в концентрации от  
30 приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ, например, от приблизительно 5 мМ  
до приблизительно 25 мМ, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ или  
приблизительно 10 мМ. Альтернативно, буферная система присутствует в составах в  
концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 15 мМ, от приблизительно  
16 мМ до приблизительно 30 мМ, от приблизительно 31 мМ до приблизительно 45 мМ  
35 или от приблизительно 46 мМ до приблизительно 50 мМ. Например, буферная система  
может присутствовать в составе в концентрации приблизительно 1 мМ, приблизительно  
2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ,  
приблизительно 6 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно  
9 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 12 мМ,  
40 приблизительно 13 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно  
16 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 19 мМ,  
приблизительно 20 мМ, приблизительно 21 мМ, приблизительно 22 мМ, приблизительно  
23 мМ, приблизительно 24 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 26 мМ,  
приблизительно 27 мМ, приблизительно 28 мМ, приблизительно 29 мМ, приблизительно  
45 30 мМ, приблизительно 31 мМ, приблизительно 32 мМ, приблизительно 33 мМ,  
приблизительно 34 мМ, приблизительно 35 мМ, приблизительно 36 мМ, приблизительно  
37 мМ, приблизительно 38 мМ, приблизительно 39 мМ, приблизительно 40 мМ,  
приблизительно 41 мМ, приблизительно 42 мМ, приблизительно 43 мМ, приблизительно

44 мМ, приблизительно 45 мМ, приблизительно 46 мМ, приблизительно 47 мМ, приблизительно 48 мМ, приблизительно 49 мМ и приблизительно 50 мМ. Буферная система более предпочтительно присутствует в составе в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ и еще более предпочтительно от

5 приблизительно 8 мМ до приблизительно 12 мМ. В наиболее предпочтительном варианте осуществления буферная система присутствует в концентрации приблизительно 10 мМ.

Буферная система предпочтительно содержит Tris-буфер и фосфатный буфер. Tris-буфер предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 5 мМ. Например, Tris-буфер может присутствовать в составе в

10 концентрации приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ или приблизительно 5 мМ. Tris-буфер более предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 2 мМ до приблизительно 4 мМ и еще более предпочтительно от приблизительно 3 мМ до приблизительно 4 мМ. В наиболее предпочтительном варианте осуществления Tris-буфер присутствует в

15 концентрации приблизительно 3,7 мМ.

Фосфатный буфер предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1 до приблизительно 10 мМ. Например, фосфатный буфер может присутствовать в составах в концентрации приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ,

20 приблизительно 6 мМ, приблизительно 7 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно 9 мМ или приблизительно 10 мМ. Фосфатный буфер более предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 3 мМ до приблизительно 8 мМ и еще более предпочтительно от приблизительно 5 мМ до приблизительно 7 мМ. В наиболее предпочтительном варианте осуществления фосфатный буфер присутствует

25 в концентрации приблизительно 6,3 мМ.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ. Данная комбинация Tris-буфера и фосфатного буфера в буферной системе является весьма необычной и

30 неизвестна из уровня техники.

Также предпочтительно, чтобы буферная система присутствовала в составах в низкой концентрации, т.е. приблизительно 15 мМ или менее, в целях снижения ионной силы состава. Это обусловлено тем, что по мере повышения ионной силы состава повышаются кинетические параметры агрегации антитела. В целях улучшения стабильности состава

35 необходимым является снижение агрегации антитела и/или скорости агрегации антитела.

В определенных вариантах осуществления составы по настоящему изобретению имеют рН около рН 7. рН составов предпочтительно варьирует в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0. Например, рН составов может составлять

40 приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4, приблизительно 5,5, приблизительно 5,6, приблизительно 5,7, приблизительно 5,8, приблизительно 5,9, приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3,

45 приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9 и приблизительно 8,0. рН составов более предпочтительно может варьировать в диапазоне от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5. В наиболее предпочтительном варианте осуществления рН

составляет приблизительно 7,0. Составы проявляют хорошую стабильность в отношении видимых частиц, не видимых невооруженным глазом частиц, низкомолекулярных белков и высокомолекулярных белков, если рН составов составляет приблизительно рН 7. рН состава можно измерить любыми способами, известными специалистам в данной области. Предпочтительным способом измерения рН является применение рН-метра с микроэлектродом. рН состава можно регулировать любыми способами, известными в данной области техники. Предпочтительными химическими веществами для изменения рН составов являются соляная кислота (HCl) и гидроксид натрия (NaOH).

В определенных вариантах осуществления составы по настоящему изобретению имеют рН выше изоэлектрической точки (pI) антитела. Изоэлектрической точкой является рН, при котором определенная молекула или поверхность не несет суммарного электрического заряда. pI биспецифического антитела можно определить любыми способами, известными специалистам в данной области. pI биспецифического антитела предпочтительно определяют с помощью изоэлектрического фокусирования в денатурирующих условиях. pI биспецифического антитела к IL-4/IL-13, содержащего переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, составляет 5,8-6,2.

### III. Неионогенные поверхностно-активные вещества

Составы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать неионогенное поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества являются химическими соединениями, стабилизирующими биологические молекулы и/или основные фармацевтические наполнители в составе. Поверхностно-активные вещества, как правило, защищают молекулы и наполнители от воздействий, индуцируемых на границе раздела воздух/раствор, и воздействий, индуцируемых на поверхности раствора, которые в иных случаях могут привести к агрегации молекул. Поверхностно-активные вещества также предотвращают образование видимых и не видимых невооруженным глазом частиц.

Неионогенное поверхностно-активное вещество предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 1% (вес/об.), например, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,5%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,3% или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,2%. Альтернативно, неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в составах в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,05% (вес/об.), от приблизительно 0,06% до приблизительно 0,10% (вес/об.), от приблизительно 0,11% до приблизительно 0,15% (вес/об.), от приблизительно 0,16% до приблизительно 0,20% (вес/об.), от приблизительно 0,20% до приблизительно 0,30% (вес/об.), от приблизительно 0,30% до приблизительно 0,40% (вес/об.), от приблизительно 0,40% до приблизительно 0,50% (вес/об.), от приблизительно 0,50% до приблизительно 0,60% (вес/об.), от приблизительно 0,60% до приблизительно 0,70% (вес/об.), от приблизительно 0,70% до приблизительно 0,80% (вес/об.), от приблизительно 0,80% до приблизительно 0,90% (вес/об.) или от приблизительно 0,90% до приблизительно 1,0% (вес/об.). Например, неионогенное поверхностно-активное вещество может присутствовать в составах в количестве приблизительно 0,01% (вес/об.), приблизительно 0,02% (вес/об.), приблизительно 0,03% (вес/об.), приблизительно 0,04% (вес/об.), приблизительно 0,05% (вес/об.), приблизительно 0,06% (вес/об.), приблизительно 0,07% (вес/об.), приблизительно 0,08% (вес/об.), приблизительно 0,09% (вес/об.), приблизительно 0,1% (вес/об.), приблизительно 0,2% (вес/об.), приблизительно 0,3% (вес/об.), приблизительно

0,4% (вес/об.), приблизительно 0,5% (вес/об.), приблизительно 0,6% (вес/об.), приблизительно 0,7% (вес/об.), приблизительно 0,8% (вес/об.), приблизительно 0,9% (вес/об.) и приблизительно 1% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления неионогенное поверхностно-активное вещество присутствует в составах в количестве от приблизительно 0,05% до приблизительно 0,2% (вес/об.).

Примеры поверхностно-активных веществ включают, без ограничения, полисорбаты, глицерин, двухосновные карбоновые кислоты, щавелевую кислоту, янтарную кислоту, формы фумаровой кислоты, формы фталевой кислоты и их комбинации. Специалисты в данной области осведомлены о том, что можно применять и другие неионогенные поверхностно-активные вещества, поскольку они являются фармацевтически приемлемыми, т.е. подходящими для введения субъектам. Неионогенное поверхностно-активное вещество предпочтительно представляет собой полисорбат. Примеры полисорбатов включают полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65 и полисорбат 80. Неионогенное поверхностно-активное вещество наиболее предпочтительно представляет собой полисорбат 80.

В иллюстративных вариантах осуществления полисорбат 80 присутствует в составах в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 1% (вес/об.). Например, полисорбат 80 может присутствовать в составах в количестве приблизительно 0,01% (вес/об.), приблизительно 0,02% (вес/об.), приблизительно 0,03% (вес/об.), приблизительно 0,04% (вес/об.), приблизительно 0,05% (вес/об.), приблизительно 0,06% (вес/об.), приблизительно 0,07% (вес/об.), приблизительно 0,08% (вес/об.), приблизительно 0,09% (вес/об.), приблизительно 0,1% (вес/об.), приблизительно 0,2% (вес/об.), приблизительно 0,3% (вес/об.), приблизительно 0,4% (вес/об.), приблизительно 0,5% (вес/об.), приблизительно 0,6% (вес/об.), приблизительно 0,7% (вес/об.), приблизительно 0,8% (вес/об.), приблизительно 0,9% (вес/об.) и приблизительно 1% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления полисорбат 80 присутствует в составах в количестве от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,2% (вес/об.). Например, полисорбат 80 может присутствовать в количестве от приблизительно 0,01% до приблизительно 1% (вес/об.), от приблизительно 0,02% до приблизительно 0,5% (вес/об.) и от приблизительно 0,03% до приблизительно 0,2% (вес/об.). В наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения полисорбат 80 присутствует в составах в количестве 0,2% (вес/об.).

#### IV. Сахара

Составы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать сахар. Сахара обычно применяют в качестве стабилизатора для высокомолекулярных белков, или в качестве криопротектора, или в качестве лиопротектора.

Сахар предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 10% (вес/об.), например, от приблизительно 2% до приблизительно 8% (вес/об.), от приблизительно 3% до приблизительно 7% (вес/об.), от приблизительно 4% до приблизительно 6% (вес/об.) или приблизительно 5% (вес/об.). Альтернативно, сахар присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.), от приблизительно 3% до приблизительно 6% (вес/об.) или от приблизительно 6% до приблизительно 10% (вес/об.). Например, сахар может присутствовать в составах в количестве приблизительно 1% (вес/об.), приблизительно 2% (вес/об.), приблизительно 3% (вес/об.), приблизительно 4% (вес/об.), приблизительно 5% (вес/об.), приблизительно 6% (вес/об.), приблизительно 7% (вес/об.), приблизительно 8% (вес/об.), приблизительно 9% (вес/об.) или приблизительно 10% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления сахар присутствует в составах

в количестве от приблизительно 3% до приблизительно 7% (вес/об.) и более предпочтительно в количестве приблизительно 5%.

Примеры сахаров включают, без ограничения, моносахариды, дисахариды и полисахариды. Примеры сахаридов включают глюкозу, сахарозу, мальтозу, трегалозу, декстрозу, ксилит, фруктозу и маннит. Специалисты в данной области осведомлены о том, что можно применять и другие сахара, поскольку они являются фармацевтически приемлемыми, т.е. подходящими для введения субъектам. Сахар предпочтительно представляет собой дисахарид. Сахар более предпочтительно представляет собой сахарозу.

В определенных вариантах осуществления сахароза присутствует в составах в количестве приблизительно 1% - 10% (вес/об.). Например, сахароза может присутствовать в составе в количестве приблизительно 1% (вес/об.), приблизительно 2% (вес/об.), приблизительно 3% (вес/об.), приблизительно 4% (вес/об.), приблизительно 5% (вес/об.), приблизительно 6% (вес/об.), приблизительно 7% (вес/об.), приблизительно 8% (вес/об.), приблизительно 9% (вес/об.) или приблизительно 10% (вес/об.). Сахароза предпочтительно может присутствовать в количестве от приблизительно 3% до приблизительно 7% (вес/об.) или от приблизительно 4% до приблизительно 6% (вес/об.). Сахароза наиболее предпочтительно присутствует в составах в количестве приблизительно 5% (вес/об.).

#### V. Неионогенные стабилизаторы

Составы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать неионогенный стабилизатор. Стабилизаторы относятся к широкой категории наполнителей, которые могут варьировать по функции от объемообразующего средства до добавки, солюбилизующей терапевтическое средство или способствующей предотвращению денатурации или прилипанию к стенке емкости. Стабилизаторы также минимизируют образование высокомолекулярных белков.

Неионогенный стабилизатор предпочтительно присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 10% (вес/об.), например, от приблизительно 2% до приблизительно 8% (вес/об.), от приблизительно 2% до приблизительно 5% (вес/об.), от приблизительно 2% до приблизительно 4% (вес/об.) или приблизительно 3% (вес/об.). Альтернативно, неионогенный стабилизатор присутствует в составах в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 2% (вес/об.), например, от приблизительно 2% до приблизительно 4% (вес/об.), от приблизительно 4% до приблизительно 6% (вес/об.), от приблизительно 6% до приблизительно 8% (вес/об.) или от приблизительно 8% до приблизительно 10% (вес/об.). Например, неионогенный стабилизатор может присутствовать в составах в количестве приблизительно 1% (вес/об.), приблизительно 2% (вес/об.), приблизительно 3% (вес/об.), приблизительно 4% (вес/об.), приблизительно 5% (вес/об.), приблизительно 6% (вес/об.), приблизительно 7% (вес/об.), приблизительно 8% (вес/об.), приблизительно 9% (вес/об.) или приблизительно 10% (вес/об.). В конкретных вариантах осуществления неионогенный стабилизатор присутствует в составах в количестве от приблизительно 1% до приблизительно 5% (вес/об.), более предпочтительно от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.) и наиболее предпочтительно приблизительно 3% (вес/об.).

Примеры стабилизаторов включают, без ограничения, многоатомные сахароспирты; аминокислоты, такие как пролин, аргинин, лизин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аланин, орнитин, L-лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.п.; органические сахара или сахароспирты, такие как лактоза, трегалоза, стахиоза, арабит, эритрит, маннит, сорбит, ксилит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин и т.п., в том

числе циклиты, такие как инозит; полиэтиленгликоль; полимеры аминокислот; серосодержащие восстановители, такие как мочеви́на, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин,  $\alpha$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные полипептиды (т.е. имеющие <10 остатков); белки, такие как

5 человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, сахара́иды, моносахари́ды, такие как ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахари́ды, такие как лактоза, мальтоза и сахароза; трисахари́ды, такие как рафиноза; полисахари́ды, такие как декстран, и т.п. Специалисты в данной области осведомлены

10 о том, что можно применять и другие неионогенные стабилизаторы, поскольку они являются фармацевтически приемлемыми, т.е. подходящими для введения субъектам. Неионогенный стабилизатор предпочтительно представляет собой аминокислоту. Неионогенный стабилизатор более предпочтительно представляет собой пролин или глицин. Неионогенный стабилизатор наиболее предпочтительно представляет собой

15 пролин. Альтернативно, неионогенный стабилизатор представляет собой маннит.

В определенных вариантах осуществления пролин присутствует в составах в количестве приблизительно 1%-10% (вес/об.). Например, пролин может присутствовать в составе в количестве приблизительно 1% (вес/об.), приблизительно 2% (вес/об.),

20 приблизительно 3% (вес/об.), приблизительно 4% (вес/об.), приблизительно 5% (вес/об.), приблизительно 6% (вес/об.), приблизительно 7% (вес/об.), приблизительно 8% (вес/об.), приблизительно 9% (вес/об.) или приблизительно 10% (вес/об.). Пролин предпочтительно может присутствовать в количестве от приблизительно 1% до приблизительно 5% (вес/об.) или от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.). Пролин наиболее предпочтительно присутствует в составах в количестве

25 приблизительно 3% (вес/об.).

В определенных альтернативных вариантах осуществления маннит присутствует в составах в количестве приблизительно 1%-10% (вес/об.). Например, маннит может присутствовать в составе в количестве приблизительно 1% (вес/об.), приблизительно 2% (вес/об.),

30 приблизительно 3% (вес/об.), приблизительно 4% (вес/об.), приблизительно 5% (вес/об.), приблизительно 6% (вес/об.), приблизительно 7% (вес/об.), приблизительно 8% (вес/об.), приблизительно 9% (вес/об.) или приблизительно 10% (вес/об.). Маннит предпочтительно может присутствовать в количестве от приблизительно 1% до приблизительно 5% (вес/об.) или от приблизительно 1% до приблизительно 3% (вес/об.). Маннит наиболее предпочтительно присутствует в составах в количестве

35 приблизительно 3% (вес/об.).

#### V. Другие наполнители

Кроме того, составы по настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать другие наполнители, в том числе, без ограничения, воду для инъекций, разбавители, солубилизирующие средства, смягчающие средства,

40 дополнительные буферы, неорганические или органические соли, антиоксиданты, консерванты, объемообразующие средства, хелатообразователи, средства, регулирующие тоничность, и т.п. Предпочтительно, однако, чтобы составы по настоящему изобретению не содержали других наполнителей, за исключением описанных выше. Другие фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы,

45 такие как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980), могут быть включены в состав при условии, что они не оказывают отрицательное влияние на желаемые характеристики состава. В конкретном варианте осуществления состав практически не содержит консервантов, хотя в альтернативных вариантах

осуществления при необходимости можно добавлять консерванты. Например, в лиофилизированные составы могут быть включены криопротекторы или лиопротекторы.

#### VI. Жидкие или лиофилизированные составы

5 Составы по настоящему изобретению могут представлять собой жидкие составы либо лиофилизированные составы. Составы предпочтительно представляют собой жидкие составы. Жидкие составы более предпочтительно являются готовыми для инъекции. Альтернативно, составы могут представлять собой лиофилизированные порошки. Лيوфилизированные порошки предпочтительно являются готовыми для  
10 объединения с растворителем непосредственно перед введением.

#### VII. Иллюстративные составы

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предусматривает жидкий состав на основе антитела, подходящий для подкожного введения, при этом состав содержит:

15 приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3;

20 приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ;

приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80;

приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и

25 приблизительно 3% (вес/об.) пролина;

где pH состава составляет приблизительно pH 7.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предусматривает жидкий состав на основе антитела, подходящий для подкожного введения, при этом состав содержит:

30 приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3;

35 приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ;

приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80;

приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и

40 приблизительно 3% (вес/об.) маннита;

где pH состава составляет приблизительно pH 7.

В альтернативном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предусматривает стабильный лиофилизированный состав на основе антитела, подходящий для подкожного введения, при этом состав содержит:

45 приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные

последовательности SEQ ID NO: 1 и 3;

приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации приблизительно 6,3 мМ;

- 5     приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80;  
       приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и  
       приблизительно 3% (вес/об.) пролина;  
       где рН состава составляет приблизительно рН 7.

- 10    В другом альтернативном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение предусматривает стабильный лиофилизированный состав на основе антитела, подходящий для подкожного введения, при этом состав содержит:

- приблизительно 100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержат  
 15    вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3;

- приблизительно 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации приблизительно 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации  
 20    приблизительно 6,3 мМ;  
       приблизительно 0,2% (вес/об.) полисорбата 80;  
       приблизительно 5% (вес/об.) сахарозы и  
       приблизительно 3% (вес/об.) маннита;  
       где рН состава составляет приблизительно рН 7.

## 25    VII. Стабильность

- Составы по настоящему изобретению являются стабильными при 2-8°C в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 месяцев или дольше. В иллюстративных вариантах осуществления они являются стабильными при 2-8°C в  
 30    течение по меньшей мере приблизительно 6 месяцев или дольше. В других иллюстративных вариантах осуществления они являются стабильными при 2-8°C в течение по меньшей мере приблизительно 9 месяцев. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления они являются стабильными при 2-8°C в течение по меньшей мере приблизительно 1 года или дольше, более предпочтительно в течение  
 35    приблизительно 2 лет и еще более предпочтительно в течение приблизительно 3 лет.

## С. Способы введения

- В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения составы подходят для парентерального, внутривенного, внутримышечного, внутрикожного, подкожного введения или их комбинации. Составы по настоящему изобретению подходят для  
 40    доставки с помощью ряда методик. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения состав вводят подкожно. Например, предпочтительно, чтобы составы, содержащие 100 мг/мл биспецифического антитела к IL-4/IL-13, вводили подкожно. Следовательно, составы предпочтительно являются стерильными. Способы придания составам стерильности хорошо известны в данной области техники и  
 45    включают, например, фильтрацию через стерильные фильтрационные мембраны или стерилизацию ингредиентов состава, за исключением антител, в автоклаве при приблизительно 120°C в течение приблизительно 30 минут.

## Д. Дозировки и лекарственные формы

Эффективные дозы составов по настоящему изобретению варьируют в зависимости от многих различных факторов, в том числе от способа введения, целевого участка, физиологического состояния субъекта, без различия в отношении того, является ли субъект человеком или животным, других вводимых лекарств и того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно субъект является человеком, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, в том числе трансгенных млекопитающих. Может существовать необходимость в подборе лечебных дозировок для оптимизации безопасности и эффективности. Доза предпочтительно варьирует в диапазоне 100-200 мг/флакон.

Составы по настоящему изобретению можно вводить несколько раз. Интервалы между отдельными введениями доз могут составлять сутки, неделю, две недели, месяц или год. Интервалы также могут быть нерегулярными. В некоторых способах дозировку корректируют для достижения определенной концентрации связывающего средства, такого как антитело, в плазме крови. Дозировка и частота будут варьировать в зависимости от периода полувыведения биспецифического антитела к IL-4/IL-13 из организма субъекта. Как правило, человеческие антитела демонстрируют наибольший период полувыведения, а после них располагаются гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, отличные от человеческих.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает стандартную фармацевтическую форму, содержащую терапевтически эффективное количество состава по настоящему изобретению для лечения одного или нескольких заболеваний у субъекта посредством введения лекарственной формы субъекту. В предпочтительном варианте осуществления субъект является человеком. Человек может быть взрослым или может быть ребенком. Термин "стандартная фармацевтическая форма" относится к физически дискретной единице, подходящей в качестве стандартной дозировки для субъектов, подлежащих лечению, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для вызывания желаемого терапевтического/профилактического эффекта, вместе с цитратным буфером с необходимым рН.

Стандартная лекарственная форма может представлять собой емкость, содержащую состав. Подходящие емкости включают, без ограничения, запаянные ампулы, флаконы, бутылки, шприцы и пробирки. Емкости могут быть выполнены из ряда материалов, таких как стекло или пластик, и могут иметь стерильное входное отверстие (например, емкость может представлять собой флакон, имеющий пробку, которую можно проколоть иглой для подкожных инъекций). В предпочтительном варианте осуществления емкость представляет собой флакон. В целом, емкость должна поддерживать стерильность и стабильность состава.

В конкретных вариантах осуществления составы расфасованы во флаконы на 7, 10, 15 или 20 мл, изготовленные из прозрачного бесцветного стекла типа I, закрытые пробкой (бромбутил, покрытый фторполимером) и запечатанные обжимным колпачком с фланцем (полипропилен).

В конкретном варианте осуществления составы вторично расфасованы в емкость, такую как картонная коробка, защищающую флаконы от света.

Составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Этого можно достичь, например, путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Например, жидкие составы по настоящему изобретению можно стерилизовать путем фильтрации с помощью фильтра на 0,2 мкм или 0,22 мкм.

Е. Способы лечения

В данном документе дополнительно предусмотрены способы лечения заболевания или нарушения, опосредованного IL-4 и/или IL-13, при этом способы включают введение субъекту состава по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления заболевание, опосредованное IL-4 и/или IL-13, представляет собой формы рака, воспаление, аутоиммунные заболевания, инфекции, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания органов дыхания, неврологические заболевания и метаболические заболевания.

Составы по настоящему изобретению можно применять для лечения, подавления или предупреждения заболевания, такого как аллергическое заболевание, заболевание, опосредованное Th2, заболевание, опосредованное IL-13, заболевание, опосредованное IL-4, и/или заболевание, опосредованное IL-4/IL-13. Примеры таких заболеваний включают лимфому Ходжкина, астму, аллергическую астму, атопический дерматит, атопическую аллергию, неспецифический язвенный колит, склеродермию, аллергический ринит, COPD 3, идиопатический легочный фиброз, хроническое отторжение трансплантата, блеомицин-индуцированный легочный фиброз, радиационно-индуцированный легочный фиброз, гранулема легких, прогрессирующий системный склероз, шистосомоз, фиброз печени, рак почки, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, синдром Сезари, астму, септический артрит, герпетический дерматит, хроническую идиопатическую крапивницу, неспецифический язвенный колит, склеродермию, гипертрофическое рубцевание, болезнь Уиппла, доброкачественную гиперплазию простаты, легочное нарушение, в котором играет роль рецептор IL-4, состояние, в котором играет роль разрушение эпителиального барьера, опосредованное рецепторами IL-4, нарушение со стороны пищеварительной системы, в котором играет роль рецептор IL-4, аллергическую реакцию на лекарство, болезнь Кавасаки, серповидно-клеточную анемию, синдром Черджа-Стросс, болезнь Грейвса, преэклампсию, синдром Шегрена, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, аутоиммунную гемолитическую анемию, пищевод Барретта, аутоиммунный увеит, туберкулез, муковисцидоз, аллергический бронхолегочный микоз, хроническое обструктивное заболевание легких, блеомицин-индуцированные пневмопатию и фиброз, легочный альвеолярный протеиноз, респираторный дистресс-синдром взрослых, саркоидоз, синдром гиперпродукции IgE, идиопатический гиперэозинофильный синдром, аутоиммунную пузырчатку, обыкновенную пузырчатку, буллезный пемфигоид, тяжелую миастению, синдром хронической усталости, нефроз.

Термин "аллергическое заболевание" относится к патологическому состоянию, при котором у пациента проявляется гиперчувствительность к веществу, которое обычно является неиммуногенным, и формируется иммунная реакция на него. Аллергическое заболевание, как правило, характеризуется активацией тучных клеток с помощью IgE, что приводит в результате к воспалительной реакции (например, локальной реакции, системной реакции), которая может привести к появлению облегченных симптомов, таких как ринорея, к опасному для жизни анафилактическому шоку и к смерти. Примеры аллергических заболеваний включают, без ограничения, аллергический ринит (например, поллиноз), астму (например, аллергическую астму), аллергический дерматит (например, экзему), контактный дерматит, пищевую аллергию и крапивницу (круп).

Термин "заболевание, опосредованное Th2" относится к заболеванию, при котором патологию вызывает (полностью или частично) иммунный ответ (иммунный ответ Th2-типа), регулируемый CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами Th2, для которых характерна выработка IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Иммунный ответ Th2-типа связан с выработкой определенных цитокинов (например, IL-4, IL-13) и антител определенных классов (например, IgE), а

также связан с гуморальным иммунитетом. Заболевания, опосредованные Th2, характеризуются наличием повышенных уровней Th2-цитокинов (например, IL-4, IL-13) и/или антител определенных классов (например, IgE) и включают, например, аллергические заболевания (например, аллергический ринит, атопический дерматит, астму (например, атопическую астму), аллергическое заболевание дыхательных путей (AAD), анафилактический шок, конъюнктивит), аутоиммунные нарушения, ассоциированные с повышенными уровнями IL-4 и/или IL-13 (например, ревматоидный артрит, реакцию "трансплантат против хозяина", заболевание почек (например, нефритический синдром, волчаночный нефрит)), и инфекции, ассоциированные с повышенными уровнями IL-4 и/или IL-13 (например, вирусные, паразитарные, грибковые (например, вызываемые *C. albicans*) инфекции). Определенные формы рака (например, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, множественная миелома, рак головы и шеи, рак молочной железы и рак яичников) ассоциированы с повышенными уровнями IL-4 и/или IL-13 или ассоциированы с пролиферацией раковых клеток, индуцированной IL-4 и/или индуцированной IL-13. Эти формы рака можно лечить, подавлять или предупреждать с помощью составов по настоящему изобретению.

Термин "рак" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, в частности, у людей, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток, или описывает его. Примеры рака включают, без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз.

Термин "аутоиммунное заболевание" относится к доброкачественному заболеванию или нарушению, проистекающему от и направленному против собственных тканей индивидуума. Примеры аутоиммунных заболеваний или нарушений включают, без ограничения, воспалительные реакции, такие как воспалительные заболевания кожи, включающие псориаз и дерматит; аллергические состояния, такие как экзема и астма; другие состояния, связанные с инфильтрацией Т-клетками и хроническими воспалительными реакциями; атеросклероз; сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); рассеянный склероз и воспалительное нарушение со стороны центральной нервной системы (CNS).

В определенных вариантах осуществления составы по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими средствами терапии (например, средствами терапии, не являющимися составами по настоящему изобретению, которые в настоящее время вводят для предупреждения, лечения, контроля и/или уменьшения интенсивности заболевания, опосредованного IL-4 и/или IL-13. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором средства терапии вводят субъекту. Первое средство терапии можно вводить до (например, за 1 минуту, 45 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго средства терапии субъекту, имевшему, имеющему заболевание, опосредованное IL-4 и/или IL-13, или подверженному ему, одновременно с ним или после него (например, через 1 минуту, 45 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель). Любое дополнительное средство терапии можно вводить с другими дополнительными средствами терапии в любом порядке. Неограничивающие примеры средств терапии, которые можно вводить в комбинации с антителом по настоящему изобретению, включают одобренные противовоспалительные средства, приведенные в Фармакопее США и/или в "Настольном справочнике врача".

Ф. Наборы

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения включают набор, содержащий состав по настоящему изобретению. Набор может дополнительно включать одну или несколько емкостей, содержащих фармацевтически приемлемые наполнители, и включать другие материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, в том числе фильтры, иглы и шприцы. Вместе с наборами могут быть предоставлены инструкции, обычно содержащиеся в коммерческих упаковках терапевтических, профилактических или диагностических продуктов, в которых содержится информация, например, о показаниях, применении, дозировке, изготовлении, введении, противопоказаниях и/или мерах предосторожности относительно применения таких терапевтических, профилактических или диагностических продуктов.

### ПРИМЕРЫ

Как средство иллюстрации настоящего изобретения приведены следующие примеры. Примеры не предназначены каким-либо образом ограничивать объем настоящего изобретения. В целом при осуществлении на практике настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные техники фармацевтического составления, химии, молекулярной биологии, технологии рекомбинантных ДНК, иммунологии, например технологии с использованием антител, и стандартные техники получения полипептидов, которые описаны, например, в Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, volume 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, Eds.: McCafferty J. *et al.*, Humana Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); и *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

В примерах 2-6 используются следующие сокращения:

BD: биотехнологическая разработка

BsAb: биспецифическое антитело

DLS: динамическое рассеяние света

DoE: план эксперимента

DP: лекарственный препарат

DS: лекарственное вещество

DSC: дифференциальная сканирующая калориметрия

FCM: Микроскопия в проточной ячейке

FDS: составленное лекарственное вещество

FT-IR: подвергнуто Фурье-преобразованию - инфракрасная область

HAP: хроматография на гидроксиапатите

HDPE: полиэтилен высокой плотности

HMW: высокомолекулярное соединение

HPLC: высокоэффективная жидкостная хроматография

IEF: изоэлектрофокусирование

IgG: иммуноглобулин G

IL: интерлейкин

кДа: килодальтон

LMW: низкомолекулярное соединение

Nd: не определено

PEG: полиэтиленгликоль

PES: полиэфирсульфон

PS80: полисорбат 80

PVDF: поливинилидендифторид

об./мин.: оборотов в минуту

SC: подкожное

SDS-PAGE: электрофорез с додецилсульфатом натрия и полиакриламидным гелем

5 SEC: эксклюзионная хроматография

SLS: статическое рассеяние света

Sq: достаточное количество

TGA: термогравиметрический анализ

UF/DF: ультрафильтрация/диафильтрация

10 USP: фармакопея Соединенных Штатов Америки

UV-Vis: ультрафиолетовая и видимая область спектра

Вес/об.: вес/объем

WFI: вода для инъекций

XRPD: рентгеновская порошковая дифрактометрия

15 Гуманизованное биспецифическое антитело IgG4 к IL-4/IL-13, содержащее  
 переменную область тяжелой цепи, которая связывается как с IL-13, так и с IL-4,  
 содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и переменную  
 область легкой цепи, которая связывается как с IL-13, так и с IL-4, содержащую  
 аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3, (“лидерное антитело”)  
 20 использовали в следующих примерах для того, чтобы определить оптимальные условия  
 составления.

Целью следующих исследований составов (примеры 2-6) было изучить поведение  
 лидерного антитела в растворе и в высушенном посредством сублимационной сушки  
 состоянии (*т.е.* выявить основные пути распада) и определить подходящие буферные  
 25 системы для регулировки pH и добавки, которые обеспечивают хорошую стабильность  
 лидерного антитела при приблизительно 100 мг/мл, для дальнейшей разработки состава.

*Далее показаны лекарственные вещества, использованные в примерах 2-6.*

Лидерное антитело после стадии НАР-очистки (последней стадии последовательной  
 обработки):

30 Партия № RSN0169 (исследование № P5 - P6)

Буфер состава: натрий-фосфатный буфер, 75 мМ, pH 6,7

Концентрация: 10,4 мг/мл;

Партии №№ RSN0169-SZW 320, 326 и 327 (исследования № P7-P13)

Буфер состава: натрий-фосфатный буфер, 59 мМ, pH 6,9

35 Концентрация: 4,5 мг/мл;

Партия № RSN0169-SZW 330 (исследование № P14)

Буфер состава: натрий-фосфатный буфер, 55 мМ, NaCl, 20 мМ, pH 6,8

Концентрация: 4,4 мг/мл и

Партия № RSN0152 (исследование № P15-P21)

40 Буфер состава: натрий-фосфатный буфер, 55 мМ, NaCl, 20 мМ, pH 6,8

Концентрация: 3,9 мг/мл

В каждом анализе состава концентрацию лидерного антитела корректировали в  
 конце UF/DF в воде или конечном буфере, а затем дополнительно разводили  
 соответствующими количествами концентрированного буфера и растворов добавок с  
 45 получением желаемого конечного состава (детали см. в таблице 1).

Таблица 1 Детали корректировки составов			
№ анализа	Начальная концентрация <sup>a</sup>	Начальный буфера	Конечная концентрация <sup>b</sup>

P5-7	2 мг/мл	Вода	1 мг/мл
P12	95 мг/мл	Вода	85 мг/мл
P13	112 мг/мл	Вода	100 мг/мл
P14-16	27 мг/мл	Вода	20 мг/мл
P15	125 мг/мл	Вода	100 мг/мл
17	46 мг/мл	Вода	38 мг/мл
P18	46 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	38 мг/мл
P20	42 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	35 мг/мл
P21	42 мг/мл	Фосфат/Tris, 3,5 мМ	35 мг/мл
<i>a</i> Концентрация и буфер после UF/DF и корректировки			
<i>b</i> Концентрация после разведения концентрированным буфером и растворами добавок			

Каждый состав стерилизовали путем фильтрации (Millex® GV, Millipore, 0,22 мкм, PVDF) в ламинарном потоке и фракцию распределяли в стеклянные флаконы 1 типа, соответствовавшие каждому моменту времени исследования стабильности, кроме исследования с замораживанием/размораживанием, для которого использовали полипропиленовые пробирки.

В примерах 2-6 определяли условия механического воздействия и термического воздействия для составов.

Для того, чтобы оценить влияние встряхивающего воздействия на образцы составов для анализа № P5-7, флаконы встряхивали при 350 об./мин в течение 2-15 ч. при комнатной температуре с помощью Rota Test 74401, а затем анализировали.

Для того, чтобы оценить влияние воздействия прохождения через иглу на образцы составов для анализа № P12, 13, 16-18 и 20, возможное влияние прохождения через иглу (*т.е.* напряжения сдвига в игле) оценивали с помощью шприцев для HPLC (Unimetrics Corporation, 100 мкл), если были доступны образцы малого объема, и с помощью шприцев Terumo, 26G×1/2-0,45×12 мм, если были доступны образцы большего объема.

Для того, чтобы оценить влияние термического воздействия на образцы составов для анализа № P5-7 и 13, флаконы хранили при 45°C в течение 1 и 2 недель, а затем анализировали. Необходимую температуру для термического воздействия определяли с помощью DSC. Образцы для анализов № P5-7 и 13 также хранили при 5°C в течение 2 недель, а затем анализировали.

Для того, чтобы оценить влияние термического воздействия на образцы составов для анализа № P12, 15 и 21, флаконы хранили при 5°C в течение 3-6 недель и анализировали каждую неделю. Растворы перед лиофилизацией, называемые составленным лекарственным веществом (FDS), для анализов № P16-18 и 20 хранили при 5°C в течение 4-5 недель и анализировали каждую неделю. Разбавленные после лиофилизации растворы для анализов № P14, 16-18 и 20 хранили при 5°C в течение 24 ч., а затем анализировали.

#### ПРИМЕР 1 - ОПТИМИЗАЦИЯ pH

Первой стадией в процессе разработки состава было определение оптимального pH для лидерного состава на основе антитела. Для того, чтобы определить оптимальный pH, использовали низкую концентрацию лидерного антитела (1 мг/мл в противоположность 100 мг/мл), поскольку эта низкая концентрация лидерного антитела была достаточной для определения оптимального pH. В таблице 2 показаны составы, протестированные в данном исследовании.

Состав № P5-х	Буферная система	pH	Концентрация
1	Цитрат, 100 мМ	4,5	1 мг/мл
2	Цитрат, 100 мМ	5,0	1 мг/мл

3	Цитрат, 100 мМ	5,5	1 мг/мл
4	Цитрат, 100 мМ	6,0	1 мг/мл
5	Фосфат, 100 мМ	6,5	1 мг/мл
6	Фосфат, 100 мМ	7,0	1 мг/мл
7	Фосфат, 100 мМ	7,5	1 мг/мл
8	Tris, 100 мМ	8,0	1 мг/мл
9	Tris, 100 мМ	8,5	1 мг/мл

В данном исследовании состав 1 не был стабильным, поскольку он приводил к конформационной нестабильности лидерного антитела. Более конкретно, у лидерного антитела наблюдалась тенденция разворачиваться. Кроме того, состав 9 приводил к дезамидированию. Таким образом, было определено, что оптимальный pH для лидерного состава на основе антитела будет находиться в узком диапазоне около значения pH 7,0.

Последующие исследования других параметров состава, таких как буферы, поверхностно-активные вещества и стабилизаторы, включали более высокие концентрации лидерного антитела. Эти последующие исследования, когда использовали высокие концентрации лидерного антитела, подтвердили вышеуказанные выводы касательно оптимального pH для лидерного состава на основе антитела.

#### ПРИМЕР 2 - БУФЕРНАЯ СИСТЕМА/ИОННАЯ СИЛА (СОЛЬ)

##### Буферы

Следующей стадией в процессе разработки состава было определение оптимального буфера для лидерного состава на основе антитела. Тестировали несколько разных буферов, таких как гистидиновый, фосфатный, Tris и их комбинации, в нескольких разных анализах.

Таблица 3  
Анализ № P6 - подбор буферной системы при 1 мг/мл

Состав № P6-х	Буферная система	pH	Концентрация
1	Гистидин 10, мМ	6,5	1 мг/мл
2	Фосфат, 10 мМ	6,5	1 мг/мл
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл
4	Фосфат, 10 мМ	7,5	1 мг/мл
5	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл
6	Tris, 10 мМ	7,5	1 мг/мл
7	Фосфат, 60 мМ	7,0	1 мг/мл

Таблица 4  
Анализ № P7 - подбор соли при 1 мг/мл

Состав № P7-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 70 мМ
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 140 мМ
3	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 70 мМ
4	Tris, 10 мМ	7,0	1 мг/мл	NaCl, 140 мМ

Таблица 5  
Анализ № P13 - подбор буфера/соли при 100 мг/мл

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

Таблица 6  
Состав буферных систем

Буферная система (кислота/основание)	pH	Концентрация кислоты	Концентрация основания
--------------------------------------	----	----------------------	------------------------

	Лимонная кислота/NaOH	4,5		Sq для pH 5,0
	Лимонная кислота/NaOH	5,0		Sq для pH 5,0
	Лимонная кислота/NaOH	5,5		Sq для pH 5,5
	Лимонная кислота/NaOH	6,0		Sq для pH 6,0
5	Дигидрофосфат натрия/NaOH	6,5		Sq для pH 6,5
	Дигидрофосфат натрия/NaOH	6,5		Sq для pH 6,5
	Дигидрофосфат натрия/NaOH	7,0		Sq для pH 7,0
	Дигидрофосфат натрия/NaOH	7,0		Sq для pH 7,0
	Дигидрофосфат натрия/NaOH	7,0		Sq для pH 7,0
	Дигидрофосфат натрия/NaOH	7,5		Sq для pH 7,5
10	Дигидрофосфат натрия/NaOH	7,5		Sq для pH 7,5
	Фосфорная кислота/Tris-аминометан	8,0	Sq для pH 8,0	
	Фосфорная кислота/Tris-аминометан	8,5	Sq для pH 8,5	
	Фосфорная кислота/Tris-аминометан	7,0	Sq для pH 7,0	
	Фосфорная кислота/Tris-аминометан	7,5	Sq для pH 7,5	
	HCl/L-гистидин	6,5	Sq для pH 6,5	
15	Дигидрофосфат натрия/Tris-аминометан	7,0		
	Дигидрофосфат натрия/Tris-аминометан	7,0		

При обработке и составлении составов фильтрованные образцы составов для анализа и контроля не содержали видимые и не видимые невооруженным глазом частицы, и анализ SEC продемонстрировал чистоту  $\leq 92,0\%$  в связи с тем, что начальное DS содержало 5,5% НМВ.

Температуры начала и денатурации, полученные с помощью DSC, указывали на лучшую термостабильность у следующих буферных систем для регулировки pH: фосфатной с pH 6,5 и 7,0: № P5-5, P5-6, P6-2, P6-3; Tris с pH 7,0 и 7,5: № P6-5, P6-6;

для которых температура начала составляла примерно 61°C по сравнению, например, с 48°C для pH 4,5 и 59°C для гистидинового буфера.

Значения коллоидной стабильности, полученные с помощью SLS, указывали на лучшую стабильность у следующих буферных систем для регулировки pH: фосфатной с pH 7,5: № P6-4

Tris с pH 7,0 и 7,5: № P6-5, P6-6;

для которых второй вириальный коэффициент составлял около  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> по сравнению, например, со значениями  $0,4 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> для гистидинового буфера и  $1,5 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup> для фосфатного буфера с pH 7,0.

Разные уровни загрязнения частицами наблюдали через 1 ч. 30 мин. встряхивающего воздействия (см. фигуру 3).

В отношении видимых частиц кандидатными буферными системами для регулировки pH, демонстрировавшими хорошую стабильность в анализе № P5, были следующие: фосфатная с pH 6,5, 7,0 и 7,5: № P5-5, P5-6 и P5-7;

Tris с pH 8,0 и 8,5: № P5-8 и P5-9.

Анализ № 6 выполняли для этих двух буферных систем со значениями pH от 6,5 до 7,5. Кандидатами, демонстрировавшими наилучшую стабильность, были следующие: фосфатная с pH 7,0 и 7,5: № P6-3 и P6-4;

Tris с pH 7,0 и 7,5: № P6-5 и P6-6.

Основные значения pH, по-видимому, лучше подходят для минимизации образования частиц.

Встряхивающее воздействие и термическое воздействие (2 недели при 45°C) являются значимыми способами для установления различий между буферными системами для

регулировки рН в отношении не видимых невооруженным глазом частиц.

Кандидатными буферными системами для регулировки рН, обеспечивавшими хорошую стабильность, были следующие:

анализ № 5: составы от № P5-6 до P5-9, т.е., рН  $\geq 7,0$ ;

5 анализ № 6 (см. фигуру 4 и фигуру 5):

- фосфатная, 7,5: № P6-4;

- Tris, 7,5: № P6-6;

за ними следовали следующие:

- фосфатная с рН 7,0: № P6-3;

10 - Tris с рН 7,0: № P6-5.

Следует отметить, что гистидиновый буфер (№ P6-1) продемонстрировал важный дестабилизирующий эффект при всех условиях воздействия.

Измерения НИАС подтверждали данные визуального осмотра: основные значения рН лучше подходили для минимизации образования частиц. Кроме того, при одинаковом рН в составах на основе фосфата наблюдалось немного меньше не видимых

15 невооруженным глазом частиц, чем в Tris-буферной системе.

Касательно анализа № 5 и 6 термическое воздействие демонстрировало интересные результаты как в отношении НМВ, так и LMW. Следует отметить, что состав № P5-1 (рН 4,5) подвергался полному распаду через 1 неделю при 45°C также, как и состав №

20 P5-2 через 2 недели при 45°C. Эти два образца исключали из последующего анализа.

В отношении НМВ результаты через 2 недели при 45°C были аналогичными для составов от № P5-6 до P5-9 (рН  $\geq 7,0$ ) и лучшими для № от P5-5 до P5-3 по мере снижения рН от 6,5 до 5,5. Для анализа № 6 подтверждалась данная тенденция, и кандидатными буферными системами для регулировки рН, обеспечивавшими хорошую стабильность,

25 были следующие (см. фигуру 6):

фосфатная с рН 6,5: № P6-2.

Tris с рН 7,0: № P6-5;

гистидиновая с рН 6,5: № P6-5.

Таким образом, рН 6,5 обеспечивал лучшую стабильность в отношении минимизации образования НМВ, чем рН 7,0, который сам по себе был лучше, чем рН 7,5. Кроме того,

30 при одном и том же рН (7,0 и 7,5) составы на основе Tris обеспечивали немного меньше НМВ, чем фосфатная буферная система.

В отношении LMW составы № P5-3 - P5-5 (рН  $\leq 6,5$ ) демонстрировали хорошую стабильность через 2 недели при 45°C. Образование устойчивых полосок LMW и

35 дополнительных полосок на геле SDS-PAGE наблюдалось у составов № P5-6 - P5-9 (7,0 $\leq$ рН $\leq$ 8,5). Распад LMW был более выраженным у составов № P5-9 (Tris с рН 8,5) (см. фигуру 7), и дополнительные полоски на геле SDS-PAGE были особенно видны у № P5-7 (фосфат с рН 7,5) (см. фигуру 8). Следует отметить, что продукты распада, по-видимому, были разными у фосфатной и Tris-буферных систем.

40 Анализ № 6 подтвердил эти выводы и показал, что при одном и том же рН составы на основе фосфатного буфера обеспечивали немного больше LMW, чем Tris-буферные системы.

В отношении НМВ и LMW кислотные значения рН, по-видимому, обеспечивали лучшую стабильность, чем основные, при этом у Tris было небольшое преимущество

45 по сравнению с фосфатной буферной системой.

Термическое воздействие при 45°C в течение 4 недель было значимым способом ускорения химического распада лидерного антитела (т.е. изменения характера кислотности), что подтверждалось IEF, и таким образом, выбора буферных систем для

регулировки pH, обеспечивавших хорошую стабильность лидерного антитела (см. фигуру 9). Наименее стабильными составами были составы с Tris-буфером с pH 8,5 (№ P5-9) и с фосфатным буфером с pH 7,5 (№ P6-4), поскольку в каждом из них были представлены 2 дополнительные кислотные формы в изоформном составе, и основная форма становилась второстепенной. Кандидатной буферной системой для регулировки pH, демонстрировавшей хорошую стабильность, была Tris с pH 7,0 (№ P6-5).

В заключение, на основании анализа исходного состояния и результатов программы воздействия в отношении образцов для анализа № P5 и 6 (растворов с концентрацией 1 мг/мл) был установлен pH 7,0. Данный выбор представляет собой компромисс между хорошей стабильностью в отношении видимых и не видимых невооруженным глазом частиц (основными значениями pH) и стабильностью в отношении HMW и LMW (кислотными значениями pH). В отношении буферных систем и фосфатная, и Tris демонстрировали преимущества при выбранном pH: фосфатная - в отношении видимых/не видимых невооруженным глазом частиц, а Tris - в отношении HMW и LMW.

Следует отметить, что для первой оценки добавок использовали фосфатную буферную систему при 10 мМ или Tris-буферную систему при 10 мМ:

для подтверждения приведенных выше результатов в отношении растворов лидерного антитела с концентрацией 100 мг/мл,

и для тестирования процесса сублимационной сушки в отношении обеих буферных систем в отдельности.

Приведенные выше результаты были подтверждены, и обе буферные системы (№ P14-3 и P14-8) продемонстрировали хорошие результаты в ходе процесса сублимационной сушки (см. фигуру 19).

При pH 7,0 фосфатный буфер имел большую буферную емкость, чем Tris; однако в отличие от Tris, его основание имело тенденцию осаждаться во время стадий замораживания. Для объединения преимуществ Tris и фосфатного буфера была выбрана смесь этих двух буферных систем: фосфат, 6,3 мМ и Tris, 3,7 мМ. Несмотря на то, что применение Tris-буфера или фосфатного буфера известно в уровне техники (применение каждого в отдельности), комбинирование Tris-буфера и фосфатного буфера в буферной системе крайне нетипично и не известно в уровне техники.

Проводимость (выбор pH и буфера)

Раствор перед лиофилизацией имел проводимость примерно 300 мкСм/см, что теоретически давало проводимость DP после разбавления, равную 850 мкСм/см.

Сперва пробовали широко используемый буфер для mAb - гистидиновый, в его забуферивающем диапазоне при pH 6,2 и 6,6 и при концентрации 10 мМ. При pH 6,2 возникла проблема нерастворимости, связанная с осаждением лидерного антитела при комнатной температуре (см. фиг. 29). При pH 6,6 раствор немного опалесцировал при комнатной температуре, второй вириальный коэффициент был низким -  $0,4 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>. В отличие от большинства mAb, для лидерного антитела гистидиновый буфер не был подходящим.

Затем пробовали другой широко используемый буфер - фосфатный, в его забуферивающем диапазоне при pH 6,5, 7,0 и 7,5 и при концентрации 10 мМ. Для pH 6,5 и 7,0 второй вириальный коэффициент был ниже  $1,5 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>, что означало низкую коллоидную стабильность. Для pH 7,5 второй вириальный коэффициент составлял около  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>, что означало хорошую коллоидную стабильность, однако при термическом воздействии (2 недели при 45°C) наблюдалось более существенное снижение чистоты (увеличение количества и HMW, и LMW), чем при pH

6,5 и 7,0. Фосфатный буфер является хорошим буфером, однако при кислотном рН низкая коллоидная стабильность, а при основном рН лидерное антитело чувствительно к термическому воздействию.

Для того, чтобы расширить зону подбора буфера, Tris тестировали в его забуферивающем диапазоне при рН 7,0 и 7,5 и при концентрации 10 мМ. Оба значения рН обеспечивали хорошую коллоидную стабильность, при этом вириальный коэффициент составлял около  $3,0 \cdot 10^{-4}$  мл.моль/г<sup>2</sup>. При термическом воздействии (2 недели при 45°C) при рН 7,5 наблюдалось более существенное снижение чистоты (увеличение количества и НМВ, и ЛМВ), чем при рН 7,0. Однако Tris-буфер при рН 7,0 обеспечивал гораздо лучшую стабильность в отношении НМВ и немного лучшую стабильность в отношении ЛМВ, чем фосфатный буфер при таком же рН. Tris с рН 7,0 является лучшей буферной системой, чем Tris с рН 7,5 и фосфатная с рН 7,0. Однако для достижения хорошей буферной емкости Tris при данном рН (р<sub>ка</sub>=8,1), необходимое количество будет больше максимального используемого в серийно выпускаемом продукте.

Для того, чтобы оптимизировать буфер для лидерного антитела, выбрали комбинацию фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ для достижения хорошей буферной емкости при рН 7,0 за счет фосфата (р<sub>ка</sub>=7,2) и хорошей стабилизации лидерного антитела за счет Tris.

Как указано выше, несмотря на то, что применение Tris-буфера или фосфатного буфера известно в уровне техники (применение каждого в отдельности), комбинирование Tris-буфера и фосфатного буфера в буферной системе крайне нетипично и не известно в уровне техники.

Ионная сила/концентрация соли

Хлорид натрия (NaCl) тестировали с двумя выбранными кандидатными буферами для регулировки рН при концентрации 70 мМ в отношении растворов лидерного антитела с концентрацией 100 мг/мл.

Температуры начала и денатурации, полученные с помощью DSC, а также значение коллоидной стабильности, полученное с помощью SLS, не указывали на какой-либо значительный эффект NaCl в отношении стабильности растворов.

После механического воздействия на образцы составов для анализа № P13 и двух недель хранения при 5°C того же состава кандидаты № P13-1 и P13-3, т.е. без NaCl, демонстрировали лучшую стабильность в отношении образования НМВ (см. фигуру 10). То же, но обратное на фигуре 33.

Увеличение концентрации соли вызывало увеличение ионной силы, что вызывало увеличение кинетических показателей агрегации лидерного антитела. Таким образом, определили, что состав не должен содержать соль или осмотическое средство. Помимо этого, определили, что оптимальный состав должен содержать низкую концентрацию буфера для того, чтобы ионная сила была низкой.

### ПРИМЕР 3 - ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНОЕ ВЕЩЕСТВО

Следующей стадией в процессе разработки состава было определение оптимальных наполнителей для лидерного состава на основе антитела. Наполнители должны быть достаточными, чтобы стабилизировать лидерное антитело и подходить для лиофилизации. Тестировали несколько разных поверхностно-активных веществ, таких как полисорбаты и поллоксамеры, в различных концентрациях.

Таблица 7					
Анализ № P12- подбор добавок при 85 мг/мл					
Состав № P12-	Буферная система	рН	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2

	x				
	1	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)
	3	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)
	4	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)
5	5	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)
	6	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS80, 0,1% (вес/об.)
	7	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS20, 0,01% (вес/об.)
	8	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	PS20, 0,1% (вес/об.)
	9	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	Полоксамер, 0,05% (вес/об.)
	10	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	Полоксамер, 0,1% (вес/об.)
10	11	Фосфат, 10 мМ	7,0	85 мг/мл	-

Таблица 8					
Анализ № P23- подбор добавок при 100 мг/мл					
	Состав № P23-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка
	1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,1% (вес/об.)
15	2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,2% (вес/об.)
	3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,3% (вес/об.)

Непосредственно после отфильтровывания частиц размером 0,22 мкм образцы составов для анализа и контроля не содержали видимые и не видимые невооруженным глазом частицы. Анализ SEC показал чистоту  $\leq 92,0\%$ , обусловленную концентрацией лидерного антитела, составляющей от 4,5 мг/мл до 100 мг/мл (исходное DS содержало 3,0% HMW).

Механическое воздействие было значимым способом установления различий между кандидатными составами. В связи с тем, что было доступно ограниченное количество исходного материала, стандартное визуальное наблюдение было невозможно и, вследствие этого, применяли наблюдение в капилляре под увеличительным стеклом. В отношении видимых/не видимых невооруженным глазом частиц, кандидатами, демонстрировавшими хорошую стабильность в анализе № 12, были следующие (см. фигуру 11):

PS80, 0,1%: № P12-6;

PS20, 0,1%: № P12-8.

Среди тестируемых поверхностно-активных веществ ни одно не оказывало влияние на образование HMW по сравнению с составом без поверхностно-активного вещества, кроме № P12-8 (0,1% PS20), которое оказывало небольшой отрицательный эффект на протяжении шести недель хранения при 5°C (см. фигуру 12).

В заключение, между поверхностно-активными веществами не было сильного различия. Следующее поверхностно-активное вещество: PS80 выбирали для предотвращения образования видимых/не видимых невооруженным глазом частиц.

Далее тестировали различные концентрации PS80 в лидерном составе на основе антитела (см. таблицу 23). Концентрации PS80 от 0,05 до 0,2% тестировали в отношении встряхивающего воздействия в течение 15 часов при 350 об./мин. (комнатная температура). Образцы анализировали с помощью микроскопии в проточной ячейке, а результаты показаны в таблице 9. В таблице 9 показано, что концентрация PS80 от 0,05 до 0,2% оказывала эквивалентный стабилизирующий эффект в отношении встряхивающего воздействия при всех концентрациях. Таким образом, в составе можно использовать концентрацию PS80 от 0,05 до 0,2%.

Таблица 9
Концентрация PS80
15 ч при 350 об/мин при комнатной температуре

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

#### ПРИМЕР 4 - САХАРОЗА

Как указано выше, следующей стадией в процессе разработки состава было определение оптимальных наполнителей для лидерного состава на основе антителя. Наполнители должны быть достаточными, чтобы стабилизировать лидерное антителио и подходить для лиофилизации. Тестировали несколько разных сахаров, таких как сахароза, трегалоза и маннит, в различных концентрациях.

5

10

15

20

25

Сост. № P14-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)		
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	NaCl, 70 мМ	Маннит, 3% (вес/об.)
5	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	NaCl, 70 мМ	Маннит, 3% (вес/об.)
6	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Глицин, 1% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
7	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
8	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)

30

35

40

45

Сост. № P15-х	Буферная система	pH	Конц.	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3	Добавка 4
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	-	Пролин, 5,8% (вес/об.)
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	-	Пролин, 5,8% (вес/об.)
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Трегалоза, 10% (вес/об.)	-	-
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	-	Этанол, 2% (вес/об.)	Глутаминовая кислота, 7,3% (вес/об.)
5	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	-	PEG 400, 1% (вес/об.)	Аспаргат, 8,7% (вес/об.)
6	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Трегалоза, 10% (вес/об.)	-	Аспаргат, 8,7% (вес/об.)
7	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	Глицерин, 5% (вес/об.)	Глицин, 1,9% (вес/об.)
8	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	PEG 400, 1% (вес/об.)	-
9	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Трегалоза, 10% (вес/об.)	PEG 400, 1% (вес/об.)	Пролин, 5,8% (вес/об.)
10	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	-	Аспаргат, 8,7% (вес/об.)
11	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	Этанол, 2% (вес/об.)	-
12	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	-	Глицерин, 5% (вес/об.)	-
13	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Трегалоза, 10% (вес/об.)	Глицерин, 5% (вес/об.)	Глутаминовая кислота, 7,3% (вес/об.)

14	Tris, 10 мМ		100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	-	-	Глицин, 1,9% (вес/об.)
15	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	-	Глутаминовая кислота, 7,3% (вес/об.)
16	Tris, 10 мМ	7,0	100 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	Этанол, 2% (вес/об.)	Глицин, 1,9% (вес/об.)

5

Таблица 12  
Анализ № P16- подбор добавок и разработка способа для лиофилизата

Сост. № P16-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3	Добавка 4
1	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	-
2	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Трегалоза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	-
3	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,05% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	-
4	Фосфат, 10 мМ	7,0	100 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)	PEG 4000, 1% (вес/об.)

10

15

Таблица 13  
Анализ № P17-FDS - подбор добавок при 38 мг/мл

Сост. № P17-х-FDS	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033% (вес/об.)	Сахароза, 3,33% (вес/об.)	-
2	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033% (вес/об.)	Сахароза, 1,67% (вес/об.)	Маннит, 1% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 3,3 мМ	7,0	38 мг/мл	PS80, 0,033% (вес/об.)	-	Глицин, 0,37% (вес/об.)

20

25

Таблица 14  
Анализ № P17- подбор добавок и разработка способа для лиофилизата

Сост. № P17-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 10% (вес/об.)	-
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	190 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	-	Глицин, 2,2% (вес/об.)

30

В заключение, на основании приведенных выше исследований в качестве наполнителя выбирали сахарозу, поскольку она стабилизировала лидерное антитело. Помимо этого, хорошо известно, что сахароза является лиопротектором, поэтому она улучшит лиофилизированный состав. Фактически, лиофилизация без сахарозы приводила к увеличению количества НМВ (см. фиг. 19). Как было обнаружено впоследствии, 5% сахароза является оптимальной для состава.

35

#### ПРИМЕР 5 - СТАБИЛИЗАТОРЫ

Как указано выше, следующей стадией в процессе разработки состава было определение оптимальных наполнителей для лидерного состава на основе антитела. Наполнители должны быть достаточными, чтобы стабилизировать лидерное антитело и подходить для лиофилизации. Тестировали несколько разных стабилизаторов, таких как маннит, аспаратат, пролин, глицин, аргинин и лейцин, в различных концентрациях. Это можно увидеть в таблицах, приведенных ниже, и в таблицах 10-14, приведенных выше.

40

45

Таблица 15  
Анализ № P18- подбор добавок и разработка способа для лиофилизата

Сост. № P18-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Аспарат, 4,3% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Пролин, 5,8% (вес/об.)

Таблица 16  
Анализ № P20-FDS - подбор добавок при 35 мг/мл

Сост. № P20-х-FDS	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07% (вес/об.)	Сахароза, 1,75% (вес/об.)	Маннит, 1,05% (вес/об.)
2	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07% (вес/об.)	Сахароза, 1,75% (вес/об.)	Аспарат, 1,05% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07% (вес/об.)	Сахароза, 1,75% (вес/об.)	Пролин, 1,05% (вес/об.)
4	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07% (вес/об.)	Сахароза, 1,75% (вес/об.)	Глицин, 1,05% (вес/об.)
5	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,07% (вес/об.)	Сахароза, 1,75% (вес/об.)	Аргинин, 1,05% (вес/об.)

Таблица 17  
Анализ № P20 - подбор добавок и разработка способа для лиофилизата

Сост. № P20-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавка 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
2	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Аспарат, 3% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Пролин, 3% (вес/об.)
4	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Глицин, 3% (вес/об.)
5	Tris/фосфат, 10 мМ	7,0	175 мг/флакон	PS80, 0,1% (вес/об.)	Сахароза, 5% (вес/об.)	Аргинин, 3% (вес/об.)

Таблица 18  
Анализ № P21- подбор добавок при 35 мг/мл

Сост. № P21-х	Буферная система	pH	Концентрация	Добавки 1	Добавка 2	Добавка 3
1	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
2	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	Сульфобутиловый эфир β-циклодекстрина, 3% (вес/об.)
3	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	N-ацетил-цистеин, 3% (вес/об.)
4	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	Лейцин, 0,3% (вес/об.)
5	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	L-лизина монохлоргидрат, 3% (вес/об.)
6	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	N-ацетил-цистеин, 0,03% (вес/об.)
7с	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	Сахароза, 1% (вес/об.)	Маннит, 3% (вес/об.)
8	Tris/фосфат, 3,5 мМ	7,0	35 мг/мл	PS80, 0,01% (вес/об.)	-	-

с Такой же состав, как и № P21-1, но данному образцу придали инертность посредством азота при хранении при 5°С

Целью этих подборов было найти добавку для дополнительной стабилизации лидерного антитела в отношении образования НМВ (анализ № 12, 15, 20-FDS и 21). В связи с высокой подверженностью лидерного антитела агрегации предполагаемая температура длительного хранения (т.е. 5°С), как было обнаружено, является значимой

для отслеживания эффекта добавок.

План эксперимента (DoE) - модель подбора, первая ступень, матрица D-оптимального плана - был создан для наблюдения эффекта разных сахаров, полиолов, аминокислот и растворителей в отношении образования НМВ (анализ № 15). Итог данного DoE

5

Параметры	НМВ	DSC	Вывод
Сахара и полиолы	Небольшая стабилизация посредством маннита	Небольшая стабилизация посредством сахарозы и трегалозы	Небольшой положительный эффект сахаров и полиолов
Аминокислоты	Сильная стабилизация посредством аспартата и небольшая стабилизация посредством глицина, пролина и глутамина	Стабилизация посредством аспартата и небольшая стабилизация посредством глицина и пролина	Положительный эффект аспартата, глицина и пролина
Растворители	Сильная дестабилизация посредством этанола	Сильная дестабилизация посредством этанола	Отсутствие эффекта или дестабилизирующий эффект растворителей
Буферные системы	Эффект отсутствует	ND	Различие между буферными системами отсутствует

10

15

Добавки, которые, как было обнаружено, оказывали эффект на НМВ, тестировали по отдельности в анализе № 12 и 20-FDS:

аминокислоты глицин (№ P12-1 и P20-4-FDS) и пролин (№ P20-3-FDS), как было обнаружено, оказывали наилучший эффект в минимизации образования НМВ (см. фигуру 13 и фигуру 14),

20

за ними следовал маннит (№ P20-1-FDS) (см. фигуру 14),

за ним следовали сахароза (№ P12-3) и трегалоза (№ P12-4), которые были намного менее эффективными (см. фигуру 13),

25

наконец, положительный эффект 8% аспартата (№ P20-2-FDS) не был подтвержден при концентрации 4% (см. фигуру 14).

В ходе анализа № 21 тестировали несколько других добавок:

лизин (№ P21-5), как было обнаружено, оказывал небольшой положительный эффект в отношении образования НМВ (см. фигуру 15),

30

маннит (№ P21-1), как было обнаружено, был наилучшим в этом анализе.

Было обнаружено, что добавление пролина в состав оказывало два эффекта: он контролировал образование НМВ путем снижения скорости агрегации в жидком составе и он выступал в качестве объемобразующего средства для обеспечения более гладкого осадка в лиофилизированном составе. Также было обнаружено, что добавление маннита в лиофилизированный состав обуславливало гладкость осадка.

35

Далее тестировали различные концентрации пролина в лидерном составе на основе антителя (см. таблицу 23). Тестировали концентрации 1% и 3%. Образцы анализировали с помощью UPLC, а результаты показаны в таблицах 20 и 21 и на фигуре 16. Таблицы 20 и 21 показывают, что в составе можно использовать концентрацию пролина либо 1, либо 3%. Эти данные также подтверждают положительный эффект пролина в отношении кинетических показателей, касающихся НМВ. Кроме того, осадок немного более гладкий (менее складчатый) при использовании 3% пролина, что подтверждает роль пролина в качестве заполнителя (результаты не показаны).

40

F1 (1% пролина)				
Стабильность, n° 2				
Время (ч.)	% мономера (M)	1/M	1/M - 1/M0	% НМВ
0	95,0	0,01053		4,2

45

3,5	92,6	0,01080	0,00027	6,6
7	90,6	0,01104	0,00051	8,7
24	82,0	0,01220	0,00167	17,4

5 Таблица 21  
3% пролина

F5 (3% пролина)				
Стабильность, н° 2				
Время (ч.)	% мономера (М)	1/М	1/М - 1/М0	% НМВ
0	95,3	0,01049		3,8
3,5	93,2	0,01073	0,00024	6
7	91,6	0,01092	0,00042	7,8
24	84,1	0,01189	0,00140	15,1

10

В заключение, хотя образование НМВ было значительно уменьшено путем добавления наполнителей, а именно маннита и аминокислот, таких как глицин и пролин, благоприятный эффект при концентрации лидерного антитела 100 мг/мл не достаточно сильный, чтобы достичь удовлетворительного срока хранения. В связи с этим был разработан лиофилизированный состав, а также способ лиофилизации.

#### ПРИМЕР 6 - ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЕ СОСТАВЫ

Для способа сублимационной сушки от 5-5,5 мл желаемого прототипного FDS с диапазоном концентраций лидерного антитела 20-38 мг/мл распределяли в 15 мл флаконы (см. для примера таблицу 13 и таблицу 14).

Способ сублимационной сушки осуществляли в предварительно концентрированном растворе при 20-38 мг/мл в практически конечном составе в количестве 5-5,5 мл, распределенном в 15 мл флаконы.

Использовали три разных типа лиофилизированных систем от Usifroid: PL45 (анализ № 14), SMH-300 (анализ № 17) и SMH-90 (анализ № 16, 18, 20). Детали циклов лиофилизации см. в таблице 22. Наклон кривой изменения температуры между стадиями лиофилизации составлял 1°С/мин.

30 Таблица 22  
Циклы лиофилизации, использованные для каждого анализа

№ анализа	Температура замораживания T <sub>заморозки</sub>	Длительность при T <sub>заморозки</sub>	Температура первичной сушки	Продолжительность стадии первичной сушки	Температура вторичной сушки	Продолжительность стадии вторичной сушки	Время удерживания при 20°С <sup>b</sup>
14	-45°С	100 мин.	-10°С	20 ч.	30°С	7 ч.	14 ч.
16	-42°С	60 мин.	-25°С	46 ч.	30°С	18 ч.	18 ч.
17	-45°С	60 мин.	-25°С	51 ч.	30°С	21 ч.	20 ч.
18	-42°С	60 мин.	-25°С	37 ч.	30°С	18 ч.	18 ч.
20	-42°С	60 мин.	-25°С	53 ч.	40°С	18 ч.	3 ч.

35

*a* Установлена во время эксперимента в соответствии с измерением температуры продукта  
*b* Цикл заканчивался только во время стандартных часов времени работы

Полученное высушенное вещество затем разбавляли при целевой концентрации 100 мг/мл путем добавления соответствующего количества WFI (от 1,0 до 1,6 мл).

Для анализов с лиофилизацией № P16-20 1 мл растворов FDS замораживали при -20°С, единожды размораживали при комнатной температуре, а затем анализировали.

Также проводили тестирование с замораживанием и размораживанием промежуточного DS (конец стадии NAP - BD) (анализ № 9). Для данного анализа 20 мл DS в 50 мл бутылках Nalgene с HDPE замораживали и при -20°С, и при -70°С, размораживали при комнатной температуре один раз, а затем анализировали.

Применяли следующие аналитические методы:

визуальный осмотр внешнего вида (прозрачность и цвет);

поглощение света (НИАС) для количественной оценки не видимых невооруженным глазом частиц;

SEC для определения чистоты белка;

SDS-PAGE для определения чистоты белка;

5 IEF для определения неоднородности заряда;

FCM для количественной оценки не видимых невооруженным глазом частиц;

DLS для определения агрегации;

DSC для определения температуры денатурации;

SLS для определения коллоидной стабильности;

10 FT-IR-спектроскопия для определения вторичной структуры;

флуоресцентная спектроскопия для определения третичной структуры;

титрование по Карлу Фишеру для определения процентной доли остаточной воды (для лиофилизата);

15 XRPD для определения кристаллический/некристаллической матрицы осадка (для лиофилизата).

Основными критериями для выбора составов и способа лиофилизации были следующие.

Отслеживали следующие параметры:

стабильность лидерного антитела во время осуществления способа лиофилизации;

20 стабильность разбавленного раствора;

стабильность FDS (раствора перед лиофилизацией);

гладкость осадка;

время разбавления;

стабильность осадка.

25 Цикл сублимационной сушки выбирали, чтобы избежать коллапса осадка (см. таблицу 22):

температуру замораживания устанавливали ниже температуры полного отверждения, т.е. немного ниже температуры стеклования ( $T_g'$ ), которую измеряли с помощью DSC для каждого кандидатного FDS (раствора перед лиофилизацией) (см. фигуру 17).

30 Температуру первичной сушки устанавливали таким образом, что температура образца оставалась ниже температуры коллапса, которая близка  $T_g'$  (см. фигуру 17).

Все осадки, полученные в ходе различных анализов с лиофилизацией, были гладкими (см. фигуру 18), и время разбавления составляло в пределах пяти минут. Даже если эти параметры были важны для отслеживания во время разработки, они не были значимыми для установления различий между составами.

Во время стадии замораживания выбирали скорость охлаждения  $1^\circ\text{C}/\text{мин.}$ , чтобы избежать значительных сдвигов концентрации и pH лидерного антитела. Температуру вторичной сушки выбирали так (см. таблицу 22), чтобы получить уровень остаточной воды в осадке, измеренный с помощью титрования по Карлу Фишеру, ниже 1%.

40 Стабилизацию лидерного антитела оценивали с помощью SEC и SDS-PAGE в отношении чистоты и DLS и FCM в отношении образования частиц. Значимыми критериями для установления различий между составами были уровень HMW до и после разбавления и подсчет не видимых невооруженным глазом частиц после разбавления.

45 Для оценки влияния способа лиофилизации отображали уровень HMW перед лиофилизацией и после разбавления для каждого состава, а также увеличение данного уровня в процентных долях относительно уровня перед лиофилизацией (см. фигуру 19 и фигуру 20). Пунктирная линия на каждой фигуре обозначает увеличение на 10%.

Кандидатами, обеспечивавшими хорошую стабильность, были следующие:

- фосфат с 10% сахарозы: № P14-2;
- фосфат и Tris с 5% сахарозы + 3% маннита: № P14-3 и P14-8;
- фосфат с 3% маннита + 1% глицина: № P14-6;
- 5 Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% маннита: № P20-1
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% аспартата: № P20-2;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% пролина: № P20-3;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% глицина: № P20-4;

10 Следует отметить, что без каких-либо наполнителей (№ P14-1) лидерное антитело являлось весьма нестабильным при осуществлении способа лиофилизации, поскольку, как наблюдалось, количество НМВ до лиофилизации увеличивалось на примерно 130% после лиофилизации. Такой результат был ожидаем, поскольку при цикле замораживания-размораживания, выполненном для DS при -20°C и -70°C (анализ № 9), наблюдалась сильная дестабилизация лидерного антитела (см. фигуру 21) -

15 замораживание было первой стадией способа лиофилизации.

В отношении не видимых невооруженным глазом частиц сравнение с помощью FCM разбавленных растворов показало лучшую стабильность у следующих кандидатов:

- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% пролина: № P20-3;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% глицина: № P20-4;

20 Примечание: не определено для анализа № 14.

Чтобы стабилизировать лидерное антитело после разбавления осадка, использовали наполнители, которые, как было ранее обнаружено, замедляют агрегацию (см. раздел, касающийся подбора наполнителей для жидкого состава). Стабилизацию лидерного антитела после разбавления оценивали с помощью SEC в отношении чистоты и DLS и

25 FCM в отношении образования частиц. Значимыми критериями для установления различий между составами были следующие:

- уровень НМВ через 24 ч. после разбавления (хранение при 5°C);
- количество частиц после механического воздействия.

В отношении образования НМВ через 24 ч. после разбавления (хранение при 5°C)

30 кандидатами, обеспечивавшими наилучшую стабильность, были следующие (см. фигуру 22 и фигуру 23):

- фосфат с 3% маннита + 1% глицина: № P14-6;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% пролина: № P20-3;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% глицина: № P20-4;

35 за которыми следовали следующие:

- фосфат с 10% сахарозы: № P14-2;
- фосфат и Tris с 5% сахарозы + 3% маннита: № P14-3, P14-7 и P14-8;
- Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% маннита: № P20-1;

40 Чтобы оценить стабильность лиофилизата, разбавление выполняли непосредственно после изготовления и в течение от одного месяца (анализы № 16-20) до двух месяцев (анализы № 18-20) после него. Кандидатные лиофилизаты хранили при 5°C (анализ № 16-20) и 20°C (анализ № 17). Стабильность осадка оценивали с помощью SEC в отношении чистоты, с помощью FCM в отношении образования частиц и с помощью XRPD в отношении структуры осадка.

45 В отношении образования НМВ и видимых/не видимых невооруженным глазом частиц все составы, как было обнаружено, были стабильными при хранении при 5°C (см. фигуру 24 и фигуру 25). Небольшое увеличение уровня НМВ, наблюдавшееся как в анализах № 17, так и 20 через один месяц при 5°C, не повторялось в следующих

анализах (не показано). Кроме того, небольшое увеличение уровня НМВ наблюдалось при хранении при 20°C (см. фигуру 24).

Стабильность FDS, которая является важным параметром для обеспечения качественного DP, учитывали в анализах № 16-18 и 20. Стабилизацию лидерного антитела на этой стадии способа оценивали с помощью SEC в отношении чистоты и DLS и FCM в отношении образования частиц. Хранение при 5°C, как было обнаружено, было значимым для отслеживания эффекта добавок в отношении стабильности лидерного антитела. Один цикл замораживания-размораживания, выполненный для FDS, также был значимым для установления различий между составами.

В отношении стабильности лидерного антитела при хранении при 5°C результаты были описаны в разделе, касающемся добавок (см. фигуру 14). Наилучшая стабильность была получена у следующих:

Tris/фосфат с 1,75% сахарозы + 1,05% пролина: № P20-3-FDS

Tris/фосфат с 1,75% сахарозы + 1,05% глицина: № P20-4-FDS;

за которыми следовали следующие:

Tris/фосфат с 1,75% сахарозы + 1,05% маннита: № P20-1-FDS;

В отношении стабильности лидерного антитела после одного цикла замораживания-размораживания подсчет частиц, выполненный с помощью FCM, показал, что стабильными были следующие кандидатные составы:

Tris/фосфат с 1,67% сахарозы + 1% маннита: № P17-2-FDS;

Tris/фосфат с 1,75% сахарозы + 1,05% маннита: № P20-1-FDS;

Tris/фосфат с 1,75% сахарозы + 1,05% пролина: № P20-3-FDS;

В заключение, с учетом следующих критериев: стабильности лидерного антитела во время осуществления способа, вида и стабильности осадка, а также времени разбавления, стабильности разбавленного раствора и FDS, явно выделялись 2 кандидатных состава:

Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% маннита;

Tris/фосфат с 5% сахарозы + 3% пролина.

Выводы из примеров 2-6

Во время работ по получению составов-кандидатов образование видимых/не видимых невооруженным глазом частиц регулировали посредством выбора диапазона pH ( $\geq 7,0$ ), буферной системы (Tris/фосфат) и, в особенности, добавления поверхностно-активного вещества, полисорбата 80, в концентрации 0,2%.

Однако образование НМВ все еще представляло собой проблему для жидкого состава. Хотя образование НМВ было значительно уменьшено посредством выбора оптимального pH (7,0) и некоторых наполнителей (а именно сахарозы, маннита и аминокислот, таких как глицин и пролин), благоприятный эффект при 100 мг/мл не предотвращал в достаточной мере образование НМВ так, чтобы можно было ожидать удовлетворительного срока хранения жидкого состава.

В связи с этим разрабатывали лиофилизированный состав, а также способ лиофилизации. Чтобы предотвратить агрегации во время осуществления способа лиофилизации, выбирали криопротектор: сахарозу при концентрации 5%.

Стабилизирующие наполнители, выбранные для жидкого состава, тестировали с помощью способа лиофилизации на предмет лучшей стабилизации как жидкости перед лиофилизацией (концентрация: 35 мг/мл), так и разбавленного раствора (концентрация: 100 мг/мл). Несколько из этих наполнителей подходили для способа лиофилизации, и из них выбирали два: маннит и пролин при концентрации 3%. Основными критериями для выбора были следующие: гладкость и стабильность осадка, а также стабильность FDS (раствора перед лиофилизацией) и разбавленного раствора.

Два состава, приведенные в значении долгосрочной стабильности, отличались одним наполнителем (см. таблицу 23):

прототип 1: пролин;

прототип 2: маннит.

5

Таблица 23 Описание составов		
Соединение	Концентрация	Функция
Лидерное антитело	100 мг/мл	Активный ингредиент
Tris/фосфат		Буфер - pH 7,0
Полисорбат 80	0,2% (p/v)	Стабилизатор для видимых/не видимых невооруженным глазом частиц
Сахароза	5% (p/v)	Криопротектор + стабилизатор для HMW
Прототип 1: пролин, 3%	3% (p/v)	Стабилизатор для HMW + вспомогательное вещество
Прототип 2: маннит, 3%	3% (p/v)	Стабилизатор для HMW + вспомогательное вещество

10

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВОВ (примеры 7-8)

В примерах 7-8 используются следующие сокращения:

15

DP: лекарственный препарат

DS: лекарственное вещество

FD: разработка состава

FDS: составленное лекарственное вещество

FIM: первое исследование у человека

20

GRAS: общепризнанный безопасным

HDPE: полиэтилен высокой плотности

NMW: высокомолекулярное соединение

IEF: изоэлектрическое фокусирование

IL: интерлейкин

25

LMW: низкомолекулярное соединение

PC: поликарбонат

PES: полиэфирсульфон

PP: полипропилен

PVDF: поливинилиденфторид

30

RT: комнатная температура

SC: подкожный

Td1: первая температура денатурации

TOR: разрыв холодовой цепи

#### Краткое описание

35

Целью данных исследований (примеры 7-8) было улучшить стабильность FDS в отношении сильной склонности к образованию NMW у лидерного антитела в жидком состоянии.

План исследования был определен на основании более ранних данных, полученных в исследованиях составов-кандидатов (примеры 2-6), и он сфокусирован на кинетических показателях образования NMW при комнатной температуре у FDS при 35 мг/мл.

40

Все использованные буферы и наполнители уже использовались либо в представленных на рынке продуктах на основе антител, либо в других продуктах для парентерального использования, в частности, они все являются GRAS (общепризнанными безопасными). pH варьировал в диапазоне от 6,2 до 7,4.

45

В общей сложности 50 разных соединений сравнивали наряду с составом, описанным в таблице 23. Основные выводы были следующими:

значения pH примерно 6,2 снижают растворимость лидерного антитела: наблюдалось образование геля и осаждение для сукцинатного и гистидинового буферов,

соответственно;

кроме того, следует избегать использования гистидинового буфера при pH 6,6, поскольку раствор опалесцировал и был немного менее термостабильным;

в диапазоне pH от 6,6 до 7,4 отсутствовал явный эффект pH в отношении кинетических показателей образования НМВ;

увеличение ионной силы оказывало дестабилизирующий эффект в отношении кинетических показателей образования НМВ;

фосфатный и цитратный были наилучшими буферами из протестированных при условии, что они присутствовали при низкой концентрации, такой как 1,75 мМ;

из всех протестированных наполнителей наилучший стабилизирующий эффект был получен для глицина при 10 и 72 мМ и 2,4% сахарозы. Однако стабилизирующий эффект не позволил значительно замедлить образование НМВ.

В заключение, результаты из примеров 7-8 не позволили выявить новую комбинацию наполнителей, которая могла бы значительно улучшить составы, описанные в таблице 23, в отношении образования НМВ. Рекомендовалось оставить следующий состав (см. таблицу 24): фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, pH, 7,0, PS80, 0,2% (вес/об.), сахароза, 5% (вес/об.), пролин, 3% (вес/об.).

Таблица 24 Описание состава	
Компонент	Концентрация
Лидерное антитело	100 мг/мл
Фосфат	
Tris	
Сахароза	5% (вес/об.)
Пролин	3% (вес/об.)
PS80	0,2% (вес/об.)

### Введение

Лидерное антитело представляет собой сконструированное гуманизованное биспецифическое антитело (BsAb), нацеленное на цитокины IL-4 и IL-13. Его молекулярный вес, определенный с помощью масс-спектрометрии, составляет 198 кДа, а его  $I_p$ , определенная с помощью IEF, находится в диапазоне от 5,8 до 6,2.

Основные изменения способа изготовления DS реализовали в фазе Пв, а исследование сопоставимости запланировано между фазой I/Па и фазой Пв изучения качества DS и DP. Как часть изменений изготовления DS было решено выполнить исследование состава с целью уменьшить образование НМВ в жидком состоянии. Таким образом, потенциальное улучшение состава можно включить в исследование сопоставимости.

Следует отметить, что в это же время способ изготовления DP для фазы Пв оптимизировали в отношении увеличения масштаба, размораживания FDS и изменения дозы DP/флакон: 100 мг/7 мл флакон вместо 150 мг/15 мл флакон. Данное исследование проводили параллельно с разработкой состава.

Профиль продукта, являющийся в настоящее время целевым, для данного исследования (примеры 7-8) обуславливает следующие характеристики лекарственного препарата:

путь введения: SC инъекция.

форма DP: лиофилизированная;

концентрация: раствор разбавлен при 100 мг/мл;

срок хранения: 24 месяца;

температура хранения: 2°C-8°C;

дозировка: 100 мг/флакон;

первичная емкость: 7 мл трубчатый флакон 1 типа из прозрачного стекла.

Лекарственное вещество должно быть составлено при 35 мг/мл перед хранением при  $-20^{\circ}\text{C}$  в 1 л поликарбонатных бутылках. Никакие дополнительные наполнители или разведение не применяли до сублимационной сушки.

5 Исследования составов-кандидатов и исследования составов для FIM позволили сделать следующие выводы.

Следует избегать кислотного  $\text{pH} < 6,0$  (низкая термостабильность и коллоидная стабильность) и основного  $\text{pH} > 7,5$  (образование LMW и изменение заряда изоформ при термическом воздействии).

10 Количество видимых/не видимых невооруженным глазом частиц было значительно уменьшено посредством применения полисорбата 80 при концентрации 0,2% в комбинации с буферной системой фосфат/Tris,  $\text{pH} 7,0$ .

Кинетические показатели образования HMW увеличивались по мере увеличения концентрации лидерного антитела, и протестированные составы не предотвращали в 15 достаточной мере образование HMW при 100 мг/мл так, чтобы можно было ожидать удовлетворительного срока хранения жидкого состава.

Образование HMW в жидком состоянии направило разработку в сторону лиофилизированного DP, разбавляемого до немного менее, чем 1/3 от начального объема (до лиофилизации) с получением 100 мг/мл из 35 мг/мл FDS. Выбирали следующие 20 криопротектор и лиопротектор: сахарозу при концентрации 5%.

Состав, выбранный для фазы I и IIa, был следующим: фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ,  $\text{pH}$ , 7,0, PS80, 0,2% (вес/об.), сахароза, 5% (вес/об.), пролин, 3% (вес/об.).

Этот состав может быть оптимизирован в отношении образования HMW путем комбинирования наполнителей, которые, как было выявлено, оказывают небольшой 25 положительный эффект, а именно сахарозы, маннита и аминокислот, таких как глицин и пролин.

Образование HMW в жидком состоянии, как было выявлено, является основным путем распада. Кинетические показатели увеличивались по мере увеличения температуры раствора (в 10 раз медленнее при  $5^{\circ}\text{C}$ , чем при RT в DP) и по мере увеличения 30 концентрации лидерного антитела:

FDS при 35 мг/мл при RT:  $\Delta\text{HMW} = +1,6\%$  за 7 ч. и  $+4,1\%$  за 24 ч.

DP при 100 мг/мл при RT:  $\Delta\text{HMW} = +0,6\%$  за 1 ч. и  $+3,5\%$  за 5 ч.

#### Цели

35 Целью данного исследования (примеры 7-8) было увеличить стабильность лидерного антитела в жидком состоянии в отношении образования HMW. Для того, чтобы поставить количественные цели для данного исследования, были предложены следующие значения:

5 ч. при RT после разбавления DP для определения стабильности при применении:  $\Delta\text{HMW} < +1\%$  за 5 ч.,

40 12 ч. TOR для FDS для того, чтобы облегчить изготовление DP:  $\Delta\text{HMW} < +1\%$  за 12 ч.

Эти целевые значения учитывают условия применения разбавленного DP при 100 мг/мл и условия способа изготовления, когда FDS при 35 мг/мл находится вне условий низких температур. Эти значения необходимо корректировать в зависимости от целевого 45 профиля качества препарата.

#### План исследования

Предложенным подходом для данного исследования (примеры 7-8) было провести подбор комбинированных наполнителей с широким кругом составов при концентрациях

лидерного антитела 35 мг/мл.

Подбор составов был сосредоточен на стабилизирующих наполнителях, которые потенциально могли влиять на образование НМВ. Для данного исследования было решено следующее.

5 При подборе PS80 и сахарозу оставляли при концентрациях, использованных в фазе I составления, поскольку не было продемонстрировано какого-либо отрицательного влияния в отношении образования НМВ при этих концентрациях, и наблюдалось сильное положительное влияние в отношении способа изготовления и/или разбавления.

10 Диапазон рН сузили до диапазона от 6,2 до 7,4, поскольку в предыдущих исследованиях было показано преимущество поддержания рН на значении примерно рН 7.

15 Проверяли 5 буферов для инъекций в данном диапазоне рН, отдельно или в комбинации с несколькими наполнителями: другими буферными системами и/или добавками (аминокислотами, сахарозой (помимо тех, которые уже содержались в составе фазы I) и главным образом солями).

#### Лекарственное вещество

DS, использованные в данном исследовании (примеры 7-8), описаны в таблице 25.

20 Таблица 25  
Описание DS

Номер партии, №	Тип	Дата изгот.	Изготовитель	Состав	Концентрация	Хранение	Для анализов использовали
LT-10006-DS	FDS			фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ, сахароза, 1,75%, пролин, 1,05%, PS80, 0,07%	33 мг/мл	-20°C	H04-150-190
25 VAB-YKR1-000079	DS			Сахароза, 2,1%	42 мг/мл	-20°C	H04-193

#### Лекарственный препарат

30 DP, использованные в данном исследовании (примеры 7-8), были составлены с составом фазы I/IIa (фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, рН, 7,0, PS80, 0,2%, сахароза, 5%, пролин, 3%) (см. таблицу 26).

35 Таблица 26  
Описание DP

№ лиофилизата DP	Дата изгот.	Изготовитель	Концентрация/форма	Из FDS №
H04-016			150 мг/15 мг флакон	CER0315 и CER0375
H04-046			150 мг/15 мг флакон	CER0378, CER0382 и CER0392
C1016207			150 мг/15 мг флакон	GMP2
H04-193			100 мг/7 мл флакон	H04-193

#### Состав(ы) компонентов

40 Составы компонентов для каждого анализа из примеров 7-8 приведены ниже в таблице 27.

45 Таблица 27  
Состав компонентов

№ анализа состава	Буферная система	рН	Номинальный состав наполнителя	Номинальная концентрация (мг/мл)
H04-150 A1	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
H04-150 A2	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Tris, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
H04-150 A3	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Гистидин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25

	H04-150 A4	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Пролин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-150 A5	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
5	H04-150 A6	Сукцинат, 10 мМ	6,2	Tris, 10 мМ - глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	Предварительное тестирование (P-H04-144)	Гистидин 10, мМ	6,2	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	Предварительное тестирование (P-H04-148)	Гистидин 10, мМ	6,2	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-150 B1	Гистидин 10, мМ	6,6	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
10	H04-150 B2	Гистидин 10, мМ	6,6	Tris, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-150 B3	Гистидин 10, мМ	6,6	Пролин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-150 B4	Гистидин 10, мМ	6,6	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-150 C	-	6,8	Сахароза, 2,1% - PS80, 0,07%	36,25
15	H04-150 D	Фосфат, 3,33 мМ/Tris, 1,92 мМ	6,9	Сахароза, 8,42% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 A1	Цитрат, 10 мМ	6,6	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 A2	Цитрат, 10 мМ	6,6	Tris, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 A3	Цитрат, 10 мМ	6,6	Гистидин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
20	H04-163 A4	Цитрат, 10 мМ	6,6	Пролин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 A5	Цитрат, 10 мМ	6,6	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 A6	Цитрат, 10 мМ	6,6	Tris, 10 мМ- глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 B1	Фосфат, 10 мМ	6,6	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
25	H04-163 B2	Фосфат, 10 мМ	7,0	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 B3	Фосфат, 10 мМ	7,0	Tris, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 B4	Фосфат, 10 мМ	7,0	Гистидин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-163 B5	Фосфат, 10 мМ	7,0	Пролин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
30	H04-163 B6	Фосфат, 10 мМ	7,0	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 A1	Tris, 10 мМ	7,0	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 A2	Tris, 10 мМ	7,4	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 A3	Tris, 10 мМ	7,4	Сукцинат, 10 мМ, NaCl, 7,5 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
35	H04-172 A4	Tris, 10 мМ	7,0	Гистидин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 A5	Tris, 10 мМ	7,4	Гистидин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 A6	Tris, 10 мМ	7,4	Глицин, 10 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-172 B1	Фосфат, 1,75 мМ	7,0	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
40	H04-172 B2	Фосфат, 1,75 мМ	7,0	Сахароза, 4% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 A1	-	6,8	Сахароза, 4,15% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 A2	-	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 B1	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 B2	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Сахароза, 4,15% - PS80, 0,07%	36,25
45	H04-185 B3	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	Бензоат натрия, 37,8 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 B4	Фосфат, 1,75 мМ	6,8	NaCl, 38,5 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 B5	Фосфат, 5,25 мМ	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25

	H04-185 C1	Цитрат, 5,25 мМ	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 C2	Цитрат, 1,75 мМ	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 C3	Цитрат, 1,75 мМ	6,8	Сахароза, 4,15% - PS80, 0,07%	36,25
5	H04-185 C4	Цитрат, 10 мМ	6,8	Глицин, 72 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-185 D	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,8	Пролин, 91 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-187 A1	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,7	Пролин, 91 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
10	H04-187 A2	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	6,8	Пролин, 91 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-187 A3	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	7,0	Пролин, 91 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-187 A4	Фосфат, 2,22 мМ/Tris, 1,28 мМ	7,2	Пролин, 91 мМ - сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
	H04-190 A1	-	6,8	Сахароза, 20,5% - PS80, 0,07%	20
	H04-190 A2	-	6,8	Сахароза, 13,42% - PS80, 0,07%	36,25
15	H04-190 A2	-	6,8	Сахароза, 1,75% - PS80, 0,07%	36,25
<i>a</i> Количество наполнителей выражено в % вес/об.					

### Способ изготовления

Составы из примеров 7-8 изготавливали с использованием концентрированного раствора лидерного антитела, который был получен с помощью UF/DF, при концентрации 42 мг/мл в 2,1% сахарозы. Этот раствор лидерного антитела разводили концентрированными маточными растворами наполнителей.

### Способ UF/DF

Во время осуществления способа UF/DF (примеры 7-8) исходный раствор белка при 35 мг/мл сначала концентрировали до 40 мг/мл, затем заменяли буфер. После диафильтрации раствор белка концентрировали до концентрации выше 42 мг/мл, что было целевой конечной концентрацией (см. таблицу 28).

Использованный материал и условия осуществления способа для каждого случая UF/DF описаны в таблице 28. В конце UF/DF концентрацию лидерного антитела корректировали до 42 мг/мл в 2,1% растворе сахарозы.

Таблица 28  
Параметры UF/DF при изготовлении

№ анализ- зов состава	Мембрана	Соотношение: г белка/м <sup>2</sup> мем- браны (г/м <sup>2</sup> )	Концентрация белка во время диафильтра- ции (мг/мл)	Количество объ- емов, прошедших диафильтрацию	Замена буфера	Концентрация белка в конце UF/DF (мг/мл)	
35	H04-137	Pellicon 30, 0,11 м <sup>2</sup>	216	40	9	Сахароза, 2,1%	48,5

### Корректировка состава

Раствор лидерного антитела после UF/DF (примеры 7-8) разводили соответствующими количествами концентрированных маточных растворов до получения желаемого конечного состава. Справочное описание и состав концентрированных растворов, изготовленных для данного исследования, приведены в таблице 29.

Таблица 29  
Рецептура концентрированных маточных растворов

№ анализа состава	Буферная система	Номинальный состав наполнителя	Скорректированное значение pH	
45	P-H04-138	Сукцинат, 60 мМ	-	5,9
	P-H04-139	Сукцинат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	5,9
	P-H04-140	Сукцинат, 60 мМ	Гистидин 60, мМ	6,2
	P-H04-141	Сукцинат, 60 мМ	Пролин, 60 мМ	5,9
	P-H04-142	Сукцинат, 60 мМ	Глицин, 60 мМ	5,9

	P-H04-143	Сукцинат, 60 мМ	Tris, 60 мМ - глицин, 60 мМ	5,9
	P-H04-144	Гистидин 60, мМ	-	6,1
	P-H04-145	Гистидин 60, мМ	-	6,6
	P-H04-146	Гистидин 60, мМ	Tris, 60 мМ	6,4
5	P-H04-147	Гистидин 60, мМ	Пролин, 60 мМ	6,5
	P-H04-148	Гистидин 60, мМ	Глицин, 60 мМ	6,1
	P-H04-149	Гистидин 60, мМ	Глицин, 60 мМ	6,6
	P-(H04-150)	Фос, 20 мМ/Tris 11,5 мМ	Сахароза, 40%	Корректировка отсутствовала
	P-H04-151	Цитрат, 60 мМ	-	6,4
	P-H04-152	Цитрат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	6,3
10	P-H04-153	Цитрат, 60 мМ	Гистидин 60, мМ	6,6
	P-H04-154	Цитрат, 60 мМ	Пролин, 60 мМ	6,4
	P-H04-155	Цитрат, 60 мМ	Глицин, 60 мМ	6,4
	P-H04-156	Цитрат, 60 мМ	Tris, 60 мМ- глицин, 60 мМ	6,2
	P-H04-157	Фосфат, 60 мМ	-	6,4
	P-H04-158	Фосфат, 60 мМ	-	7
15	P-H04-159	Фосфат, 60 мМ	Tris, 60 мМ	6,9
	P-H04-160	Фосфат, 60 мМ	Гистидин 60, мМ	7
	P-H04-161	Фосфат, 60 мМ	Пролин, 60 мМ	7
	P-H04-162	Фосфат, 60 мМ	Глицин, 60 мМ	6,8
	P-H04-164	Tris, 60 мМ	-	7,3
	P-H04-165	Tris, 60 мМ	-	7,7
20	P-H04-166	Tris, 60 мМ	Сукцинат, 60 мМ, NaCl, 45 мМ	7,7
	P-H04-167	Tris, 60 мМ	Гистидин 60, мМ	7,2
	P-H04-168	Tris, 60 мМ	Гистидин 60, мМ	7,5
	P-H04-169	Tris, 60 мМ	Глицин, 60 мМ	7,6
	P-H04-170	Фосфат, 10,5 мМ	-	7,2
	P-H04-171	Фосфат, 10,5 мМ	Сахароза, 13,5%	7,2
25	P-H04-173	-	Сахароза, 14,4%	Корректировка отсутствовала
	P-H04-174	-	Глицин, 432 мМ	Корректировка отсутствовала
	P-H04-175	Фосфат, 10,5 мМ	Глицин, 432 мМ	6,8
	P-H04-176	Фосфат, 10,5 мМ	Сахароза, 14,4%	6,8
	P-H04-177	Фосфат, 10,5 мМ	Бензоат натрия, 227 мМ	6,8
	P-H04-178	Фосфат, 10,5 мМ	NaCl, 231 мМ	6,8
30	P-H04-179	Фосфат, 31,5 мМ	Глицин, 432 мМ	6,8
	P-H04-180	Цитрат, 31,5 мМ	Глицин, 432 мМ	6,8
	P-H04-181	Цитрат, 10,5 мМ	Глицин, 432 мМ	6,8
	P-H04-182	Цитрат, 10,5 мМ	Сахароза, 14,4%	6,8
	P-H04-183	Цитрат, 60 мМ	Глицин, 432 мМ	6,8
	P-H04-184	Фос, 13,3 мМ/Tris 7,7 мМ	Пролин, 547 мМ	7
35	P-H04-186	Фос, 13,3 мМ/Tris 7,7 мМ	Пролин, 547 мМ	6,5
	P-H04-189 1	-	Сахароза, 37,5%	Корректировка отсутствовала
	P-H04-189 2	-	Сахароза, 70%	Корректировка отсутствовала
<i>a</i> Количество наполнителей, выраженное в %, приведено как соотношение вес/об.				

Каждый состав стерилизовали путем фильтрации (Millex® GV) в ламинарном потоке и фракцию распределяли в 2 мл стеклянные флаконы 1 типа соответствующим образом (1-2 мл) и закупоривали для каждого момента времени исследования стабильности.

#### Условия воздействия

##### Термическое воздействие

Условия термического воздействия, выполненного в примерах 7-8, в соответствии с анализами составов указаны в таблице 30.

№ анализов состава	Температурное воздействие	Время воздействия
--------------------	---------------------------	-------------------

	H04-150	RTa 5°Cb	Дни: 1, 2 и 3 Дни: 2, 3 и 6
	H04-163	RTa 5°Cb	Дни: 1, 2 и 3 Дни: 2, 3 и 7
5	H04-172	RTa 5°Cb	Дни: 1, 2, 3 и 6 Дни: 2, 3 и 6
	H04-185	RTa 5°Cb	Дни: 1, 2 и 3 Дни: 2, 3 и 6
	H04-187	RTa	16 ч., 24 ч. и 40 ч.
	H04-190	RTa	16 ч., 40 ч. и 48 ч.
	H04-193	5°Cc 25°Cc	21 ч., 30 ч. и 46 ч. 21 ч., 30 ч. и 46 ч.
10	<p>a В связи с кондиционированием воздуха в лаборатории RT варьировала от 21°C до 29°C  b Выполняли в стандартной не соответствующей GMP камере при низких температурах  c Соответствующая GMP камера с автоматическим регулированием температуры</p>		

### Описание аналитических методов

В примерах 7-8 применяли следующие аналитические методы:

визуальный осмотр внешнего вида (прозрачность и цвет);

- раствор в 7 мл флаконах осматривали при естественном освещении;

HPLC-SEC для определения чистоты белка

- 2 колонки PROSEC 300S- 250 × 4,6 мМ при 35°C;

- подвижная фаза: фосфат, 0,1 М/NaCl, 0,2 М, рН 7,0;

- обнаружение: 280 нм;

- введение: 10 мкл (концентрация 5 мг/мл);

- поток: 0,2 мл/мин.;

- общее время прогона: 40 мин

Применяли следующий аналитический метод:

UPLC-SEC для определения чистоты белка

- колонка: 1 Acquity BEH200 SEC (150 × 4,6 мМ, dp=1,7 мкм) при 40°C;

- подвижная фаза: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ/NaClO<sub>4</sub>, 300 мМ при рН 7,0;

- обнаружение: UV при 280 нм;

- введение: 1 мкл (раствор при 5 мг/мл), стандарт 3014ЕТ;

- введение: 2 мкл (растворы при 2,0 мг/мл);

- поток: 0,3 мл/мин.;

- общее время прогона: 8 мин

Осуществляли отслеживание при следующем аналитическом методе:

DSC для определения температуры денатурации:

- дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) использовали для оценки термостабильности антитела в разных составах.

- Калориметрические измерения выполняли с помощью VP-Capillary DSC от 25°C до 100°C со скоростью нагревания 1°C/мин.

- Кривая емкости обеспечивала информацию о температуре денатурации Td (°C) (максимум пика).

### Критерии оценки

SEC: результаты считали сравнимыми, если различие было равным или меньшим 0,5% значения HMW.

DSC: результаты считали сравнимыми, если различие по Td1 было равным или меньшим 0,4°C.

### Способ UPLC в сравнении с HPLC

Первый подбор (анализы № H04-150-172) выполняли с помощью способа HPLC, разработанного для фазы I. Проблема в отношении смещения базовой линии, которое влияло на определение уровня HMW, возникала, когда подряд анализировали большое

число образцов.

Для второго подбора (анализы № Н04-185-190) для того, чтобы получить точные данные динамики уровня НМВ, применяли способ UPLC, при котором не наблюдалось какого-либо смещения базовой линии. Один и тот же хроматографический профиль стандарта наблюдался даже после введения более 200 образцов в одну и ту же колонку.

#### **Эталонные составы для SEC-измерений**

Для того, чтобы сравнить разные серии в отношении динамики уровня НМВ с течением времени, состав фазы I использовали в качестве эталонного.

Для первого подбора (анализы № Н04-150-172) для каждой из 3 серий получали FDS фазы I путем разбавления с помощью WFI при 35 мг/мл лиофилизата DP № Н04-016.

Для второго подбора (анализы № Н04-185-190) для каждой из 3 серий помимо ранее указанного FDS фазы I (Н04-016) использовали другое свежееизготовленное FDS фазы I наряду с тестируемыми составами. Также использовали 3<sup>-е</sup> эталонное FDS фазы I (№ LT-10006-DS): FDS, не подвергавшееся сублимационной сушке, а только размороженное.

Неожиданно оказалось, что кинетические показатели, касающиеся НМВ, отличаются у различных эталонных составов. Для сравнения два дополнительных лиофилизата DP тестировали наряду с лиофилизатом DP № Н04-016. Различие между лиофилизатами DP стало существенным через 40 ч. при RT. Однако размороженный эталонный состав № LT-10006-DS значительно отличался от всех лиофилизатов DP, начиная с 16 ч. при RT. У лиофилизата DP наблюдались более высокие кинетические показатели, касающиеся НМВ, чем у размороженного эталонного состава № LT-10006-DS, и, следовательно, его нельзя использовать для сравнения составов, изготовленных в данном исследовании (составы для данного исследования изготавливали на основе размороженного FDS (см. раздел, касающийся способа изготовления), с составом фазы I/IIa).

При использовании одной и той же партии и свежееполученного подвергавшегося сублимационной сушке DP не наблюдалось значительного различия по кинетическим показателям, касающимся НМВ, между размороженным FDS и лиофилизатом DP. Таким образом, кинетические показатели, касающиеся НМВ, наблюдавшиеся у свежееизготовленных для данного исследования составов, будут также наблюдаться у тех же составов после сублимационной сушки.

Вывод, сделанный на основании этих анализов, нельзя распространить на все лиофилизаты DP и все размороженные FDS. Сравнение кинетических показателей, касающихся НМВ, между разными партиями может зависеть от различных параметров и потребует специального и отдельного исследования.

#### **Результаты и обсуждение**

Все составы, изготовленные в примерах 7-8, содержали по меньшей мере 1,75% (вес/об.) сахарозы и около 0,07% (вес/об.) PS80. Эти концентрации являются номинальными значениями и основываются на кратности разведения, примененной к исходному раствору лидерного антитела. В отношении концентрации PS80 было сделано допущение, что поглощением PS80 в ходе UF/DF можно пренебречь. Концентрации этого наполнителя были такие же, как в составе фазы I.

#### **ПРИМЕР 7 - ПОДБОР БУФЕРА**

В данном примере подбирали pH от 6,2 до 7,4 и в пределах данного диапазона тестировали все буферы для инъекций: сукцинатный, гистидиновый, цитратный, фосфатный и Tris.

##### **А) Тип буфера и pH**

В первом подборе (анализы № Н04-150-172) указанные выше буферы тестировали при концентрации 10 мМ в комбинации с несколькими наполнителями, которые будут

более подробно описаны в примере 8 - подборе добавок. Следует отметить, что концентрация буфера была постоянной при 10 мМ, и что ее влияние в отношении образования НМВ можно будет увидеть в разделе, касающемся концентрации буфера (пример 7).

5 DSC

Результаты DSC показали, что все составы были сравнимыми с эталонным (Td1=65,5°C), кроме составов с гистидином, которые были немного менее термостабильными (Td1=64,7°C-65,1°C) (см. фигуру 26).

#### **Визуальный осмотр в начальный момент времени**

10 Все составы были прозрачными и сравнимыми с эталонным, кроме составов при рН 6,2 и составов с гистидином при рН 6,6.

При рН 6,2 снижение растворимости наблюдалось у обоих тестируемых буферов. Составы с гистидином осаждались при RT (см. фигуру 27).

15 Составы с сукцинатом немного опалесцировали при RT, и можно было наблюдать образование геля при 5°C (см. фигуру 27), этот процесс был обратимым, если раствор снова нагревали до RT и осторожно встряхивали. Сукцинат мог иметь хелатирующие свойства.

При рН 6,6 составы с гистидином немного больше опалесцировали при RT, чем эталонный образец.

20 **Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC**

Поскольку результаты, представленные в данном документе, были получены для 3 разных серий, динамику уровня НМВ нельзя сравнивать напрямую, а только с эталонным составом.

25 Состав с гистидиновым буфером при рН 6,6 был сравнимым с эталонным составом при RT и немного лучшим при 5°C (+2,4% для гистидина отдельно и +3,2% за 144 ч. для эталонного состава).

Состав с цитратным буфером при рН 6,6 при RT был немного лучшим, чем эталонный состав (+4,6% для цитрата отдельно и +5,2% за 24 ч. для эталонного образца), и сравнимым с эталонным составом при 5°C.

30 Состав с фосфатным буфером при рН 6,6 при RT был немного лучшим, чем эталонный состав (+8,2% для фосфата отдельно и +9,0% за 48 ч. для эталонного состава), и сравнимым с эталонным составом при 5°C.

Состав с фосфатным буфером при рН 7 был сравнимым с эталонным составом при RT и 5°C.

35 Состав с Tris-буфером при рН 7 был немного хуже, чем эталонный состав при RT (+7,8% для Tris отдельно и +7,0% за 48 ч. для эталонного образца), и сравнимым с эталонным образцом при 5°C.

Состав с Tris-буфером при рН 7,4 был сравнимым с эталонным составом при RT и 5°C.

40 См. фигуру 28.

В отношении образования НМВ при рН 6,6 фосфатный и цитратный буферы были сравнимыми, а при рН 7,0 фосфатный был немного более стабилизирующим, чем Tris. Указанные выше буферы при 10 мМ нельзя напрямую сравнивать с составом фазы I/Па, поскольку эталонным составом, использованным для данного подбора, был лиофилизат, изготовленный из другой партии (см. приведенный выше раздел, касающийся эталонных составов для SEC-измерений).

#### **Вывод**

В отношении подбора буферной системы при концентрации 10 мМ можно сделать

следующие выводы.

Значения рН примерно 6,2 (около рI) снижали растворимость лидерного антитела:  
- образование геля наблюдалось для сукцинатного буфера при рН 6,2.

Осаждение наблюдалось для гистидинового буфера при рН 6,2.

5 Кроме того, следует избегать использования гистидинового буфера при рН 6,6, поскольку раствор опалесцировал и был немного менее термостабильным.

Отсутствует явная тенденция эффекта рН в пределах диапазона от 6,6 до 7,4 в отношении образования НМВ для тестируемых буферов: гистидинового, цитратного, фосфатного и Tris.

10 Эффект буфера в отношении образования НМВ очень слабый, хотя цитратный и фосфатный, как оказалось, являются наилучшими буферами при 10 мМ.

В) Точная регулировка рН для состава фазы I/IIa

Для того, чтобы определить в этом же исследовании влияние рН в отношении образования НМВ, подбирали рН в диапазоне от 6,7 до 7,2 для состава фазы I (анализы  
15 № Н04-187).

**DSC**

Результаты DSC показали, что все составы были сравнимыми с эталонным (рН 7,0) (см. фигуру 29).

**Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC**

20 Наблюдалась небольшая тенденция к уменьшению образования НМВ при увеличении рН от 6,7 до 7,2 (см. фигуру 30), однако она становилось значительной только через 24 ч. при RT (+4,1% для рН 6,7 и +3,4% для рН 7,2).

**Вывод**

Для буфера фосфат, 2,2 мМ/Tris, 1,3 мМ (состав фазы I) наблюдался небольшой  
25 эффект рН в диапазоне от 6,7 до 7,2 через 24 ч. при RT. Однако этот эффект был слабым, поскольку он не был значительным в течение первых 16 ч. Это подтверждало слабый эффект рН в отношении образования НМВ в этом диапазоне рН.

С) Концентрация буфера

Цитратный и фосфатный буферы тестировали при концентрациях меньше 10 мМ: 0,  
30 1,75, и 5,25 мМ, для того, чтобы изучить влияние концентрации буфера в отношении образования НМВ (анализы № Н04-185). Устанавливали промежуточное значение рН в тестируемом диапазоне: рН= 6,8. Все составы содержали глицин при 72 мМ для коррективы осмоляльности и, как было сказано в начале раздела, касающегося результатов и обсуждения, 1,75% сахарозы и примерно 0,07% PS80.

35 **DSC**

Результаты DSC показали, что все составы были сравнимыми с эталонным (составом фазы I) (см. фигуру 31). Следует отметить, что состав с глицином при отсутствии буфера (185A2) был немного менее стабильным, чем другие тестируемые составы (Td1 отличалась приблизительно на 1°C).

40 **Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC**

Для обоих тестируемых буферов наблюдалась небольшая тенденция к уменьшению образования НМВ при увеличении концентраций буферов, при этом наилучшие  
результаты получали при отсутствии буфера и при 1,75 мМ в буфере (*например*, +7,8% для цитратного буфера при 10 мМ и +7,0% для отсутствия буфера за 48 ч. при RT) (см.  
45 фигуру 32). Составы с цитратным буфером при 1,75 мМ и при отсутствии буфера были сравнимыми с эталонным составом (*например*, +7,1% для цитратного буфера и +7,0% для отсутствия буфера за 48 ч. при RT, при этом +6,8% для эталонного состава).

**Вывод**

Уменьшение концентрации буфера оказывало небольшой стабилизирующий эффект на кинетические показатели образования НМВ. Этот эффект, вероятно, был связан с ионной силой. Отсутствие буфера и цитратный буфер при 1,75 мМ были наилучшими кандидатами с точки зрения образования НМВ, за которыми непосредственно шел фосфат при 1,75 мМ. Буферы, протестированные с глицином при 72 мМ, были сравнимыми с составом фазы I/IIa.

#### ПРИМЕР 8 - ПОДБОР ДОБАВОК

Осуществляли подбор добавок глицина, пролина, гистидина и Tris в сочетании с подбором буфера (первый подбор: анализы № Н04-150-172) для того, чтобы выявить возможные синергетические взаимодействия между наполнителями. Подбор добавок хлорида натрия, бензоата натрия, глицина и сахарозы (второй подбор: анализы № Н04-185-190) выполняли для фосфатного или цитратного буферов, наилучших буферов, выбранных в результате первого подбора (пример 7).

Составы содержали 1,75% сахарозы и примерно 0,07% PS80.

А) Хлорид натрия и бензоат натрия

Хлорид натрия и бензоат натрия тестировали, чтобы оценить эффекты ионной силы и гидрофобных взаимодействий, соответственно, в отношении образования НМВ. Эти добавки тестировали для фосфатного буфера при 1,75 мМ с рН 6,8 при концентрации, не превышавшей осмоляльность состава фазы I (165 мосмоль/кг в FDS).

20 **DSC**

Результаты DSC показали, что состав с NaCl был сравнимым с эталонным (Td1=65,7°C для NaCl и 65,6°C для эталонного состава), тогда как состав с бензоатом натрия был немного менее термостабильным (Td1=65,0°C).

#### Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC

Для обеих протестированных добавок, наблюдался явный отрицательный эффект в отношении образования НМВ по сравнению с эталонным составом (*например*, +5,2% для NaCl при 38,5 мМ, +5,2% для бензоата натрия при 37,8 мМ и +3,2% для эталонного состава за 24 ч. при RT). Динамика была одинаковой для обоих наполнителей, но в данном документе показаны результаты только для NaCl (см. фигуру 33).

30 **Вывод**

Как видно для концентрации буфера, увеличение ионной силы с помощью NaCl или бензоата натрия оказывало явный отрицательный эффект в отношении кинетических показателей образования НМВ. Кроме того, эффект гидрофобных взаимодействий в отношении кинетических показателей НМВ, обусловленный добавлением бензоата натрия, не наблюдался.

В) Глицин, пролин, гистидин и Tris

Эти добавки (глицин, пролин, гистидин и Tris) тестировали при концентрации 10 мМ (первый подбор: анализы № Н04-150-172).

#### DSC

40 Результаты DSC показали, что все составы с указанными выше добавками были сравнимыми с составом без них (только с буфером).

#### Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC

Различия между составами были слабыми, хотя тенденции можно было наблюдать через 48 ч. при RT и 6 дней при 5°C:

45 гистидиновый буфер:

при RT:  $\emptyset$  (отсутствие добавок) = глицин > пролин > Tris;

- при 5°C:  $\emptyset$  > глицин = пролин > Tris;

цитратный буфер:

- при RT: глицин > пролин = гистидин = Tris = (Tris + глицин) > 0;  
 - при 5°C: глицин > пролин = гистидин = Tris = (Tris + глицин) = 0;  
 фосфатный буфер:

- при RT: глицин = пролин = 0 > гистидин = Tris;  
 5 - при 5°C: глицин > пролин = 0 = гистидин = Tris;  
 Tris-буфер:

- при RT: глицин > 0 = гистидин;  
 - при 5°C: глицин = 0 = гистидин.

#### **Вывод**

10 В отношении образования НМВ эффекты этих добавок были слабыми, хотя можно было наблюдать следующие тенденции:

глицин при 10 мМ оказывал небольшой положительный эффект;

гистидин и пролин при 10 мМ, по-видимому, не оказывали эффект;

15 Tris при 10 мМ не оказывал стабилизирующий эффект и даже мог оказывать небольшой дестабилизирующий эффект.

#### **С) Сахароза и глицин**

Во втором подборе (анализы № Н04-185) дополнительное количество сахарозы, составляющее 2,4% (в добавок к 1,75% сахарозы, уже содержащимся во всех составах, что обеспечивало общее количество сахарозы 4,15% (вес/об.)), и глицин при  
 20 концентрации 72 мМ тестировали с наилучшими выбранными буферами (см. раздел, касающийся подбора буфера). Эти концентрации максимально увеличивали, чтобы не превысить осмоляльность состава фазы I (165 мОсм/кг в FDS).

#### **DSC**

25 Результаты DSC показали, что все составы с 2,4% сахарозы и глицином при 72 мМ были сравнимыми с эталонным составом (*например*, в случае сахарозы Td1= 65,7°C для фосфата при 1,75 мМ и 65,6°C для эталонного состава).

#### **Исследование динамики уровня НМВ с помощью SEC**

Небольшое положительное влияние глицина было подтверждено при сравнении с  
 30 составами, содержащими только сахарозу, для цитрата при 1,75 мМ и при отсутствии буфера (см. фигуру 34). Однако это положительное влияние было значительным только через 48 ч. при RT.

#### **Вывод**

В отношении образования НМВ в представляющих интерес временных рамках (<24  
 ч. при RT) составы с сахарозой и глицином, тестированные с наилучшими кандидатными  
 35 буферами, были сравнимыми с составом фазы I.

#### **Выводы из примеров 7-8**

Для данного исследования изготавливали примерно 50 составов и сравнивали наряду  
 с рассматриваемым составом фазы I/IIa. Подбор pH осуществляли в диапазоне от 6,2  
 до 7,4, и он включал все буферы для инъекций в пределах этого диапазона pH, отдельно  
 40 или в комбинации с несколькими наполнителями (все GRAS), для того, чтобы оценить возможные синергетические взаимодействия между наполнителями.

Были сделаны следующие основные выводы:

значения pH примерно 6,2 снижают растворимость лидерного антитела: наблюдалось  
 образование геля и осаждение для сукцинатного и гистидинового буферов,  
 45 соответственно;

кроме того, следует избегать использования гистидинового буфера при pH 6,6,  
 поскольку раствор опалесцировал и был немного менее термостабильным;

в диапазоне pH от 6,6 до 7,4 отсутствовал явный эффект pH в отношении кинетических

показателей образования НМW;

увеличение ионной силы оказывало дестабилизирующий эффект в отношении кинетических показателей образования НМW;

5 фосфатный и цитратный были наилучшими буферами из протестированных при условии, что они присутствовали при низкой концентрации, такой как 1,75 мМ;

из всех протестированных наполнителей наилучший стабилизирующий эффект был получен для глицина при 10 и 72 мМ и 2,4% сахарозы. Однако стабилизирующий эффект не позволил значительно замедлить образование НМW, и

10 пролин, который не оказывал эффект при 10 мМ, можно было использовать в качестве изотонического средства (эффект пролина при 91 мМ (концентрация пролина в составе FDS фазы I) не оценивали в отношении образования НМW (*например*, путем оценивания состава FDS фазы I с пролином и без пролина).

В заключение, результаты из примеров 7-8 не позволили выявить новую комбинацию наполнителей, которая могла бы значительно улучшить рассматриваемый состав в отношении образования НМW. То есть результаты из примеров 7-8 подтверждают результаты из примеров 1-6. Рекомендовалось оставить рассматриваемый состав фазы I/IIa для исследований фазы IIb. Таким образом, рассматриваемый состав был следующим (см. таблицу 31): фосфат, 6,5 мМ/Tris, 3,7 мМ, pH, 7,0, PS80, 0,2% (вес/об.), сахароза, 5% (вес/об.), пролин, 3% (вес/об.).

20

Таблица 31 Описание состава фазы I/IIa/IIb	
Компонент	Концентрация
Лидерное антитело	100 мг/мл
Фосфат	
25 Tris	
Сахароза	5% (вес/об.)
Пролин	3% (вес/об.)
PS80	0,2% (вес/об.)

25

30 Для состава фазы III/коммерческого состава может быть выполнена количественная корректировка рассматриваемого состава (точная регулировка концентраций наполнителей без добавления новых наполнителей).

#### (57) Формула изобретения

1. Стабильный состав на основе антитела, содержащий:

35 биспецифическое антитело к IL-4/IL-13 или его антиген-связывающий фрагмент, содержащие легкую цепь формулы VL1-линкер-VL2 и тяжелую цепь формулы VH1-линкер-VH2, где VL1 и VH1 образуют антиген-связывающий домен для IL-13, а VL2 и VH2 образуют антиген-связывающий домен для IL-4;

буферную систему, подходящую для поддержания pH состава при pH 7, и маннит,

40 где концентрация солей в составе составляет 15 мМ или менее для снижения ионной силы состава, причем

VL1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 1;

VH1 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 2;

45 VL2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 3 и

VH2 содержит последовательности CDR SEQ ID NO: 4 или 5.

2. Состав по п.1, где

VL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

VH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

VL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и

VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5.

3. Состав по п.1, где легкая цепь имеет формулу N-VL1-линкер-VL2-CL, где CL представляет собой константный домен легкой цепи антитела и где тяжелая цепь имеет формулу N-VH1-линкер-VH2-CH1-CH2-CH3, где CH2-CH3 соответствует Fc-домену антитела.

4. Состав по любому из предшествующих пунктов, где линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6.

5. Состав по любому из предшествующих пунктов, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент дополнительно содержит домен константной области.

6. Состав по п.5, где домен константной области выбран из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CL.

7. Состав по п.1, где биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент представляют собой гуманизованное биспецифическое антитело IgG4 или его антиген-связывающий фрагмент.

8. Состав по любому из предшествующих пунктов, где концентрация антитела или его антиген-связывающего фрагмента составляет 100 мг/мл.

9. Состав по любому из предшествующих пунктов, где буферная система содержит по меньшей мере два буфера.

10. Состав по любому из предшествующих пунктов, где концентрация буферной системы составляет 10 мМ.

11. Состав по п.9, где буферная система содержит Tris-буфер и фосфатный буфер.

12. Состав по п.11, где концентрация Tris-буфера составляет 3,7 мМ.

13. Состав по п.11, где концентрация фосфатного буфера составляет 6,3 мМ.

14. Состав по п.11, где концентрация Tris-буфера составляет 3,7 мМ и концентрация фосфатного буфера составляет 6,3 мМ.

15. Состав по любому из предшествующих пунктов, где состав дополнительно содержит неионогенное поверхностно-активное вещество.

16. Состав по п.15, где концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 до 0,2% (масс./об.).

17. Состав по п.15, где неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.

18. Состав по п.17, где полисорбат представляет собой полисорбат 80.

19. Состав по п.18, где концентрация полисорбата 80 составляет от 0,05 до 0,2% (масс./об.).

20. Состав по п.19, где концентрация полисорбата 80 составляет 0,2% (вес/об.).

21. Состав по любому из предшествующих пунктов, где состав дополнительно содержит сахар.

22. Состав по п.21, где концентрация сахара составляет 5% (масс./об.).

23. Состав по п.21, где сахар представляет собой дисахарид.

24. Состав по п.23, где дисахарид представляет собой сахарозу.

25. Состав по п.24, где концентрация сахарозы составляет 5% (масс./об.).

26. Состав по любому из предшествующих пунктов, где концентрация маннита составляет от 1 до 3% (масс./об.).

27. Состав по п.26, где концентрация маннита составляет 3% (масс./об.).

28. Состав по любому из предшествующих пунктов, где состав представляет собой лиофилизированный состав.

29. Состав по любому из предшествующих пунктов, где состав проявляет хорошую

стабильность в отношении видимых частиц, не видимых невооруженным глазом частиц, низкомолекулярных белков и высокомолекулярных белков.

30. Стабильный лиофилизированный состав на основе антитела, содержащий:

100 мг/мл биспецифического антитела или его антиген-связывающего фрагмента,  
5 где антитело или его антиген-связывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 и 4, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 3;

10 10 мМ буферной системы, где буферная система содержит Tris-буфер в концентрации 3,7 мМ и фосфатный буфер в концентрации 6,3 мМ;

0,2% (вес/об.) полисорбата 80;

5% (вес/об.) сахарозы и

3% (вес/об.) маннита,

где pH состава составляет pH 7.

15

20

25

30

35

40

45

125

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

&lt;110&gt; SANOFI

Carayon, Sophie

Boussif, Otmane

&lt;120&gt;СОСТАВЫ НА ОСНОВЕ ВИСПЕЦИФИЧЕСКИХАНТИТЕЛКIL-4/IL-13

&lt;130&gt; 14-646-WO

&lt;150&gt; US 61/816,899

&lt;151&gt; 2013-04-29

&lt;150&gt; EP 14305160.5

&lt;151&gt; 2014-02-05

&lt;160&gt; 21

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt;Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;Анти-IL13 hB-B13 VL3

&lt;400&gt; 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr

20

25

30

126

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223>Анти-IL13 hB-B13 VH2

<400> 2

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

RU 2 690 850 C2

127

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Ser  
20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Ala Asp Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

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

Arg Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223>Анти-IL4 h8D4-8 VL1

128

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Leu Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

129

<220>

<223>Анти-IL4 h8D4-8 VH1

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala

115 120



131  
100 105 110  
Trp Gly Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120

<210> 6  
<211> 10  
<212> PRT  
<213>Искусственная последовательность  
<220>  
<223> linker  
<400> 6

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

<210> 7  
<211> 15  
<212> PRT  
<213>Искусственная последовательность  
<220>  
<223> hB-B13 VL3 CDR1  
<400> 7

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

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> hB-B13 VL3 CDR2

<400> 8

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> hB-B13 VL3 CDR3

<400> 9

Gln Gln Asn Ala Glu Asp Ser Arg Thr

1

5

133

<210> 10  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213>Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> hB-B13 VH2 CDR1  
 <400> 10

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

<210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213>Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> hB-B13 VH2 CDR2  
 <400> 11

Asp Gly Arg Ile Asp  
 1                    5

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213>Искусственная последовательность

134

<220>

<223> hB-B13 VH2 CDR3

<400> 12

Asp Gly Tyr Phe Pro Tyr Ala Met Asp Phe

1                      5                      10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> h8D4-8 VL1 CDR1

<400> 13

His Ala Ser Gln Asn Ile Asp Val Trp Leu Ser

1                      5                      10

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> h8D4-8 VL1 CDR2

135

<400> 14

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> h8D4-8 VL1 CDR3

<400> 15

Gln Gln Ala His Ser Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213>Искусственная последовательность

<220>

<223> h8D4-8 VH1 CDR1

<400> 16

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile His

1 5 10





138

<400> 21

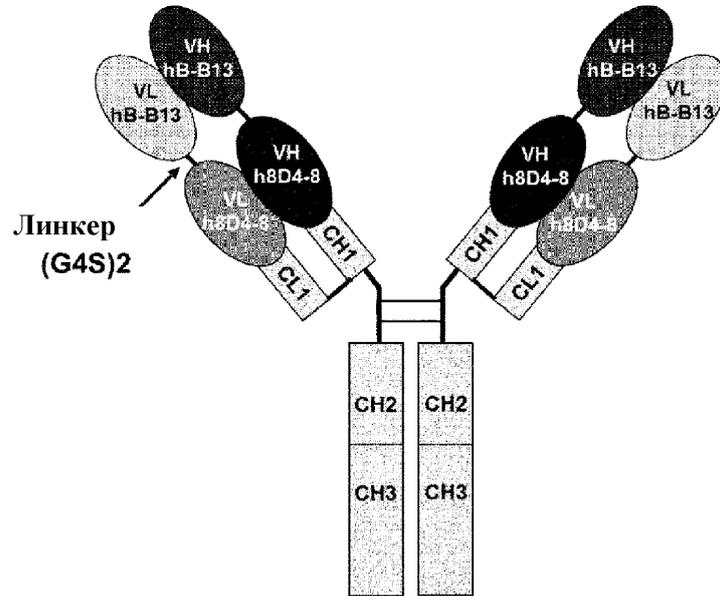
Leu Lys Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Ser Phe Tyr Phe Asp Val

1

5

10

Фигура 1



## Фигура 2

VL3 антитела hB-B13 к IL-13 (SEQ ID NO: 1)

DIVLTQSPAS LAVGLGORAT ISCR**R**ASESV**D** SYGQ**S**YMHWY QOKAGQPEKL  
 LIY**L**ASN**L**ES GVPARFSGSG SRTDFLTID PVQ**A**EDAATY YC**Q**Q**N**A**E**DSR  
 TFGGGTKLEI K

VH2 антитела hB-B13 к IL-13 (SEQ ID NO: 2)

EVQLKESGPG LVAP**G**GSLSI TCTV**S****G**FS**L**T **D**SSINWVRQP PGKGLEWLGM  
 IW**G**D**G**RI**D**YA DALKSRLSIS KDSK**S**QVFL EMT**S**LR**T**DDT ATYYCAR**D**GY  
 FPYAMDFWQQ GTSVTVSS

VL1 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQSPAS LSVSVGDTIT LTC**H**ASQ**N**ID **V**WLSWFOQ**K**P GNIPKLLI**Y**K  
 AS**N**L**H**T**G**VPS RFGSGSGTG FTLTISSLOP EDIATYYC**Q**Q **A**HSY**P**FT**F**GG  
 GTKLEIKR

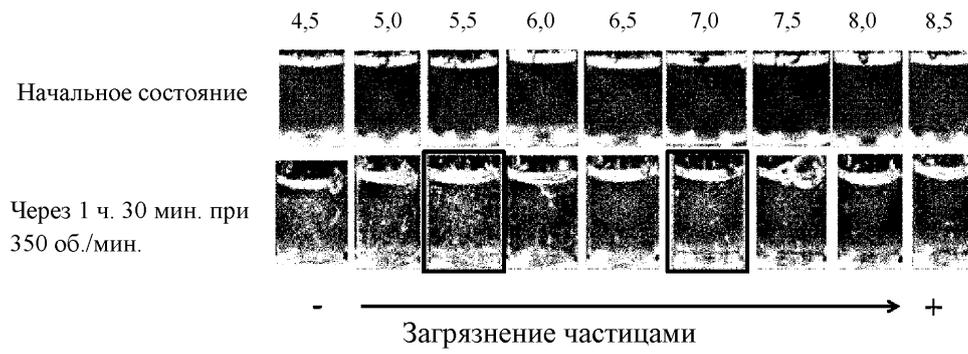
VH1 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 4)

QVQLQSSGPE LVK**F**GA**S**VKI SCKAS**G**YS**F**T **S**Y**W**I**H**WIKQR PGQGLEWIGM  
 ID**P**S**D**GET**R**L NQRFQ**G**RATL TVDE**S**T**S**TAY MQLRSPT**S**E**D** SAVYYC**T**R**L**K  
 EY**G**NY**D**S**F**Y**F** DV**W**GAG**T**L**V**T VSSA

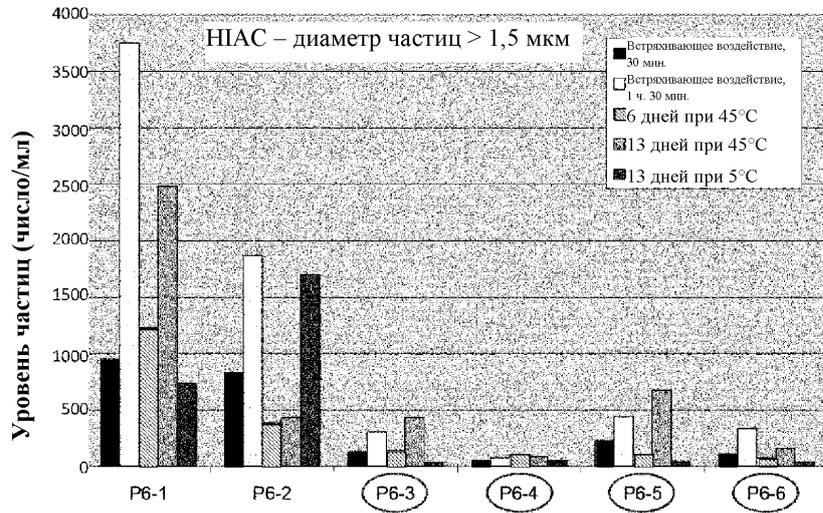
VH2 антитела h8D4-8 к IL-4 (SEQ ID NO: 5)

QVQLQSSGPE LVK**F**GA**S**VKI SCKAS**G**YS**F**T **S**Y**W**I**H**WIKQR PGQGLEWIGM  
 ID**A**S**D**GET**R**L NQRFQ**G**RATL TVDE**S**T**S**TAY MQLRSPT**S**E**D** SAVYYC**T**R**L**K  
 EY**G**NY**D**S**F**Y**F** DV**W**GAG**T**L**V**T VSSA

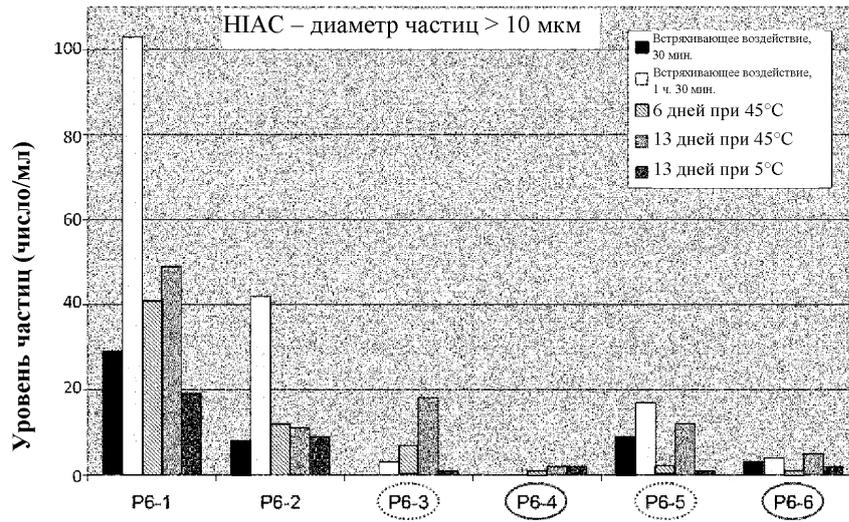
Фигура 3



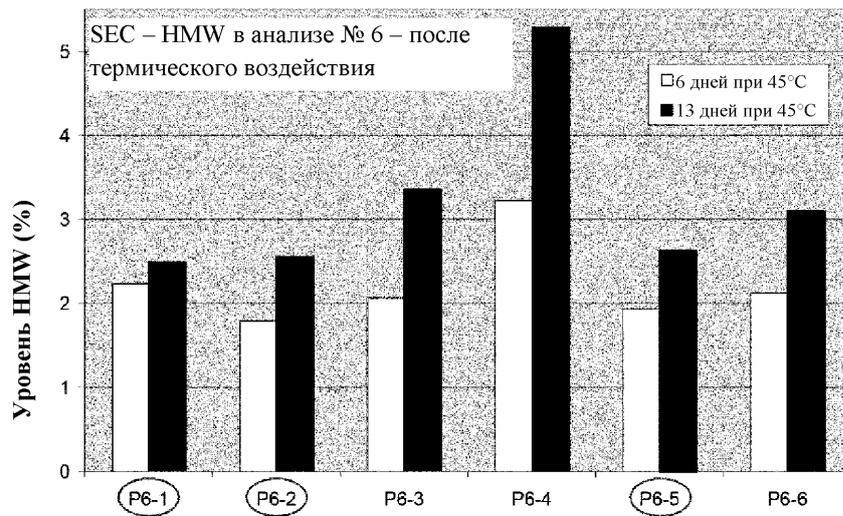
Фигура 4



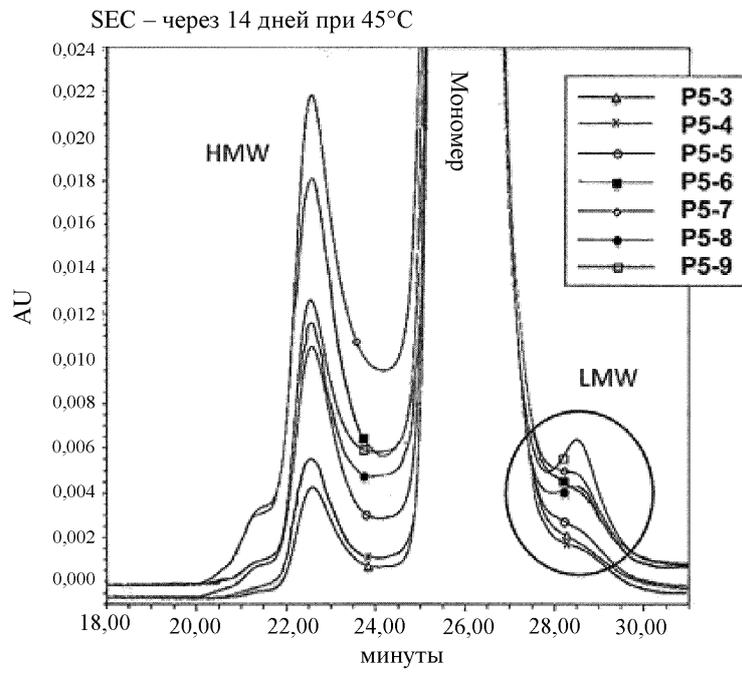
Фигура 5



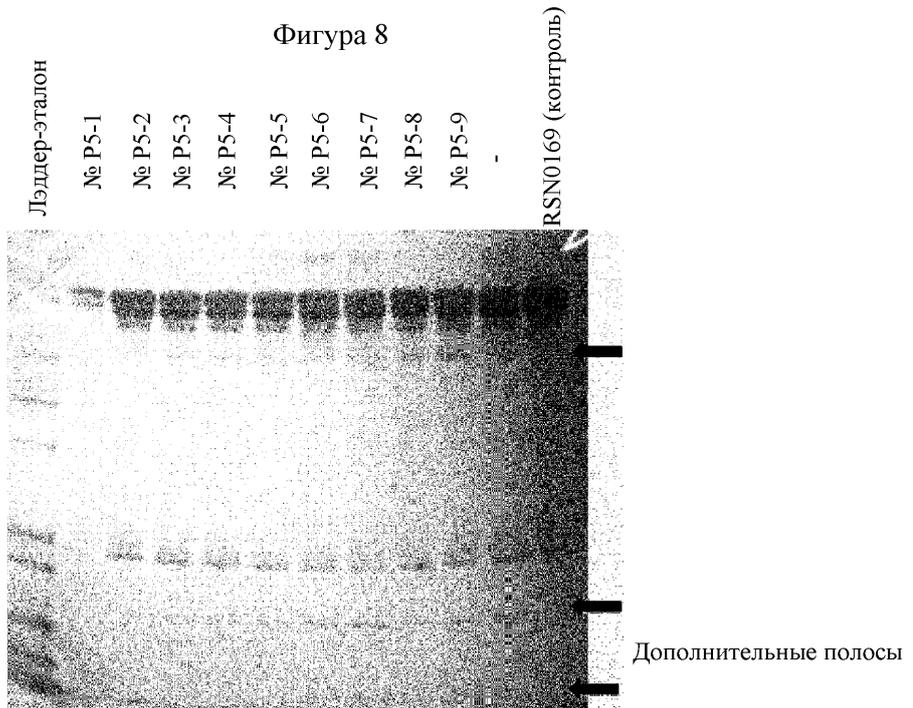
Фигура 6



Фигура 7



Фигура 8



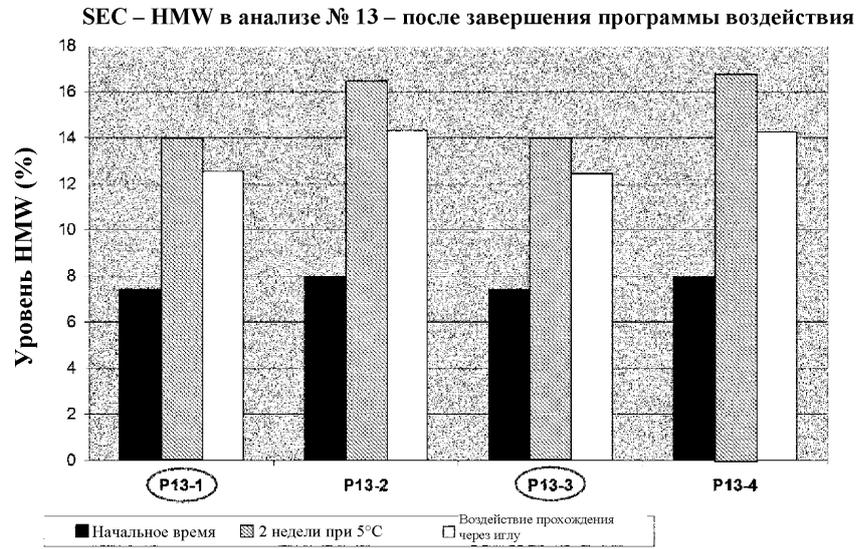
SDS-PAGE: 2 недели при 45°C

Фигура 9

IEF через 2 недели при 45°C

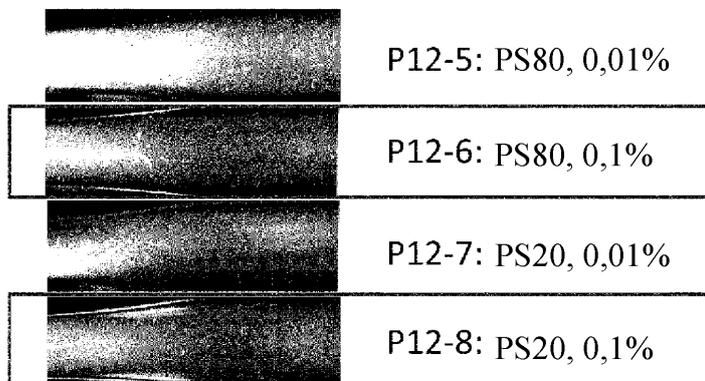


Фигура 10

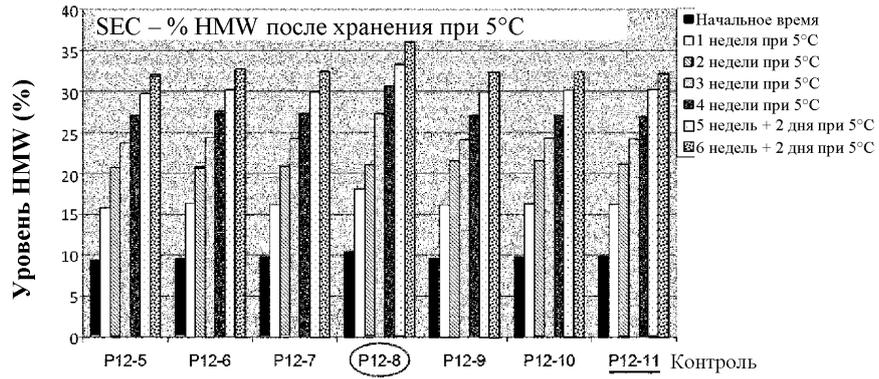


11/37

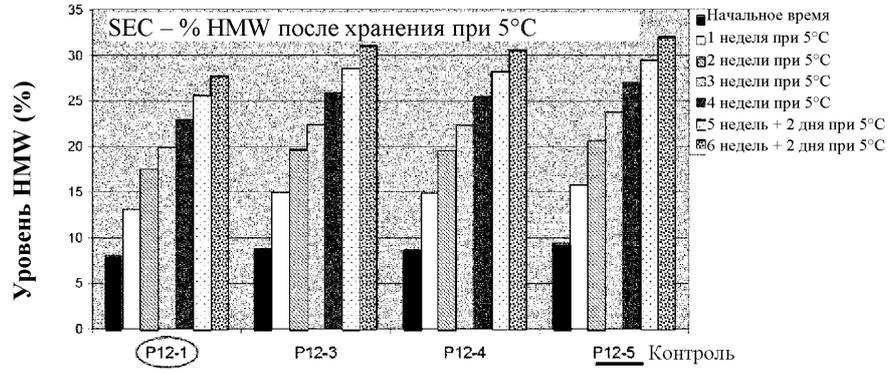
Фигура 11



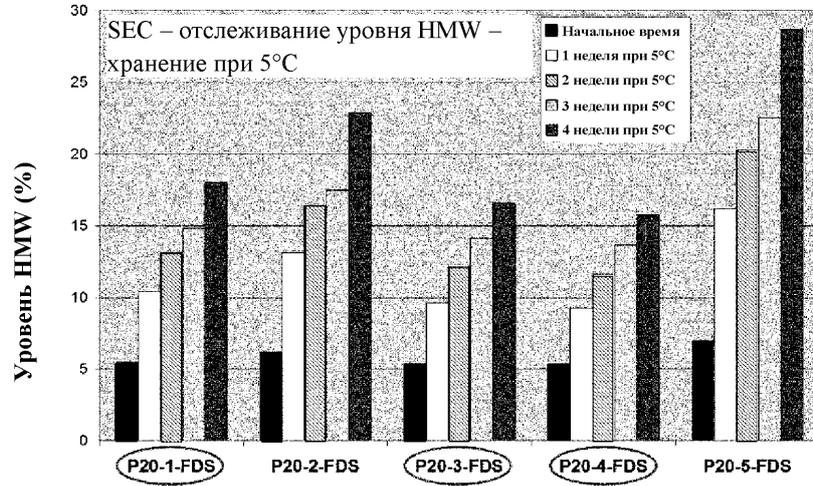
Фигура 12



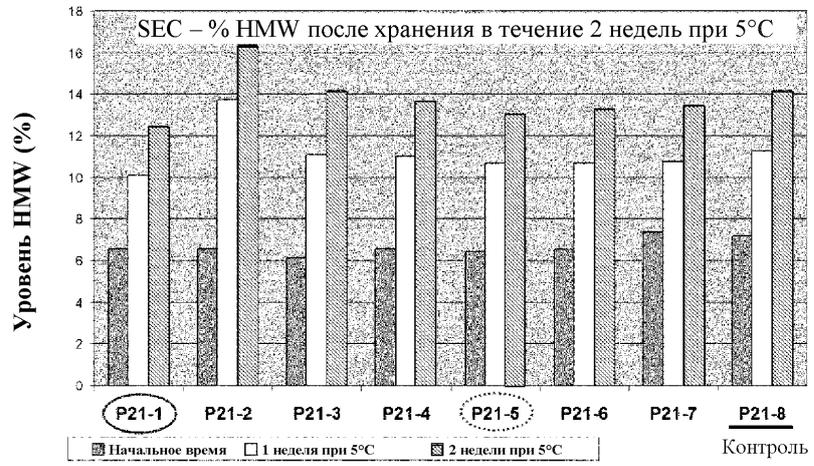
Фигура 13



Фигура 14

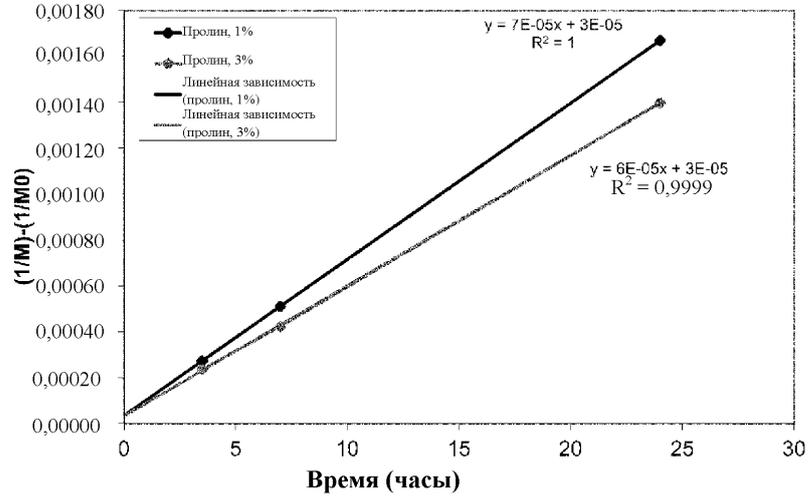


Фигура 15

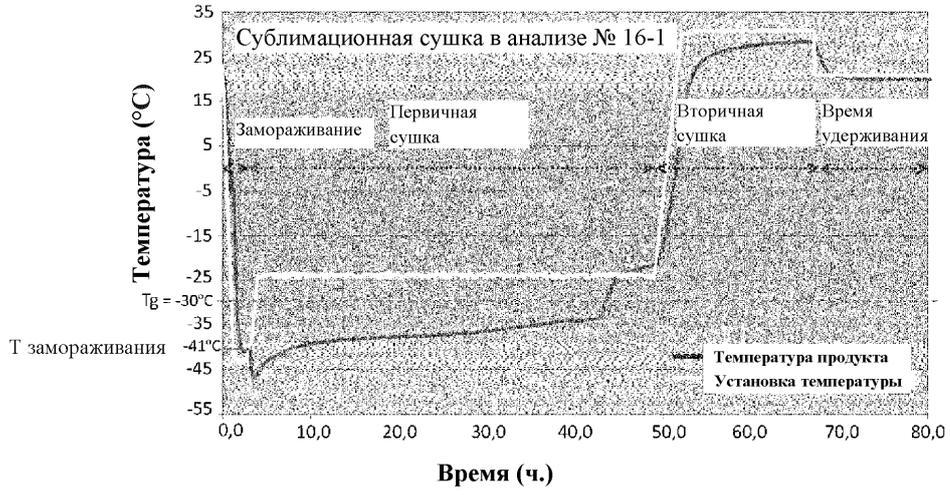


Фигура 16

Динамика  $(1/M - 1/M_0)$  в зависимости от времени при  $T=25^\circ\text{C}$

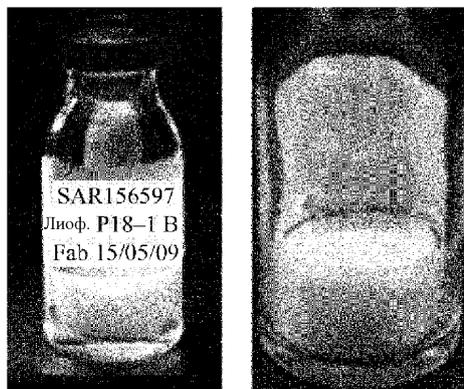


Фигура 17

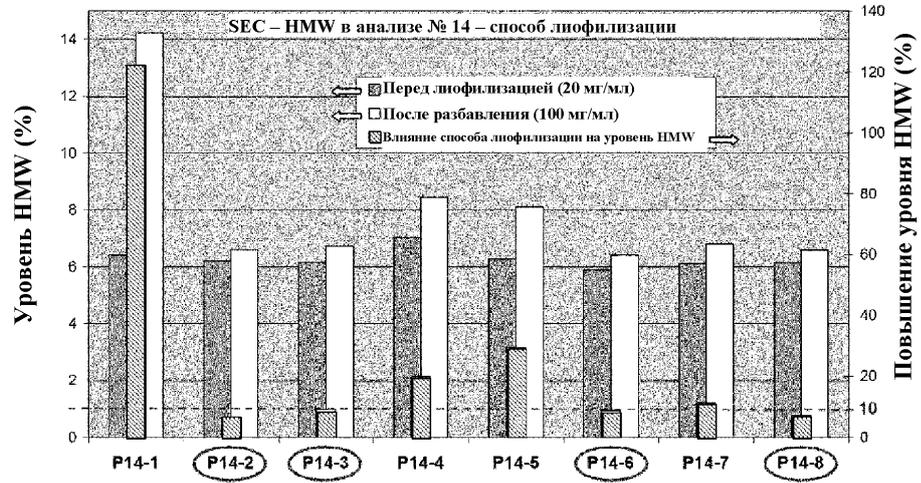


18/37

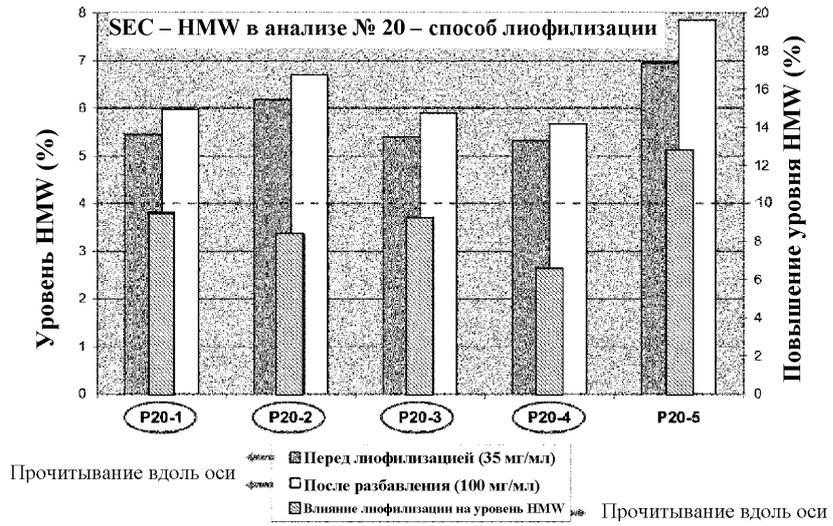
Фигура 18



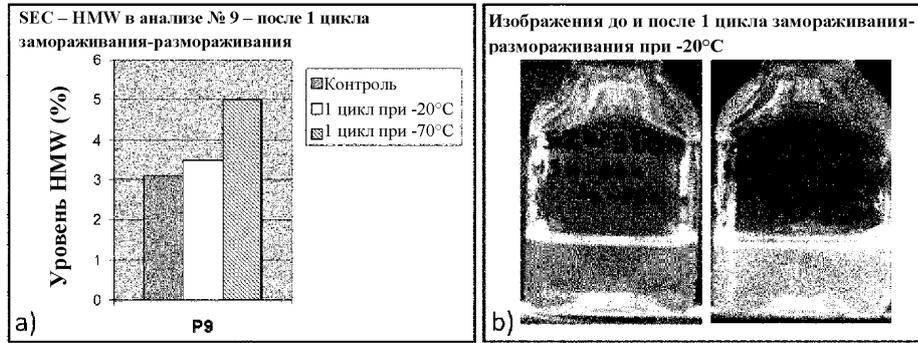
Фигура 19



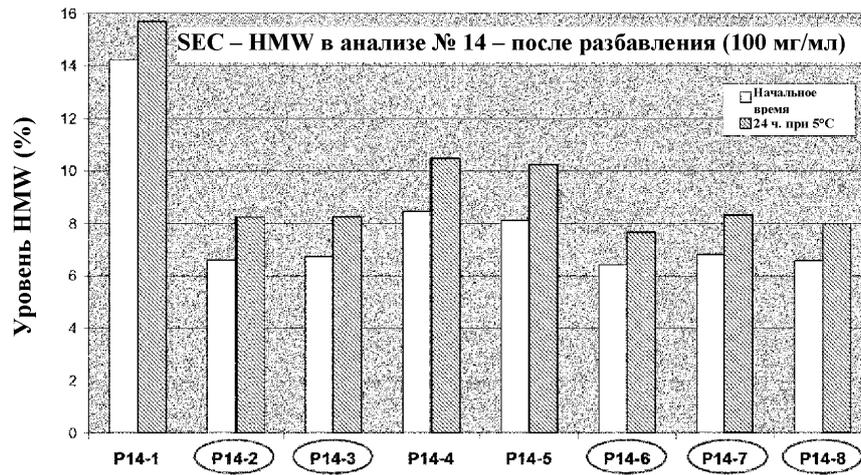
Фигура 20



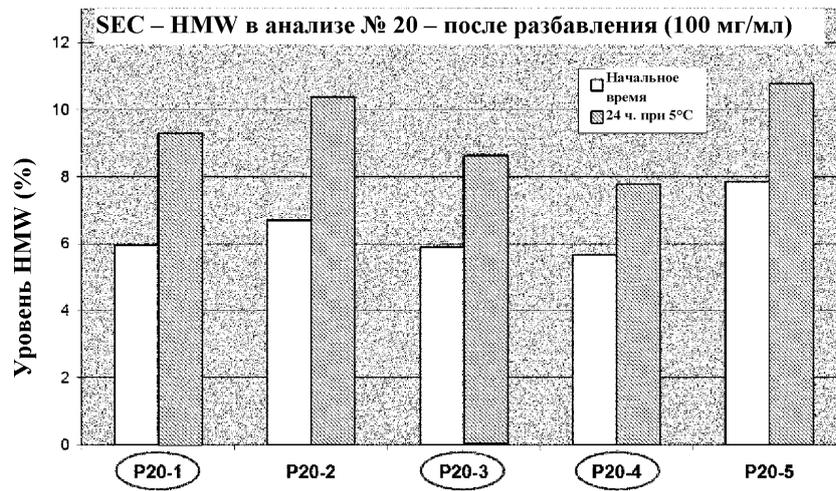
Фигура 21



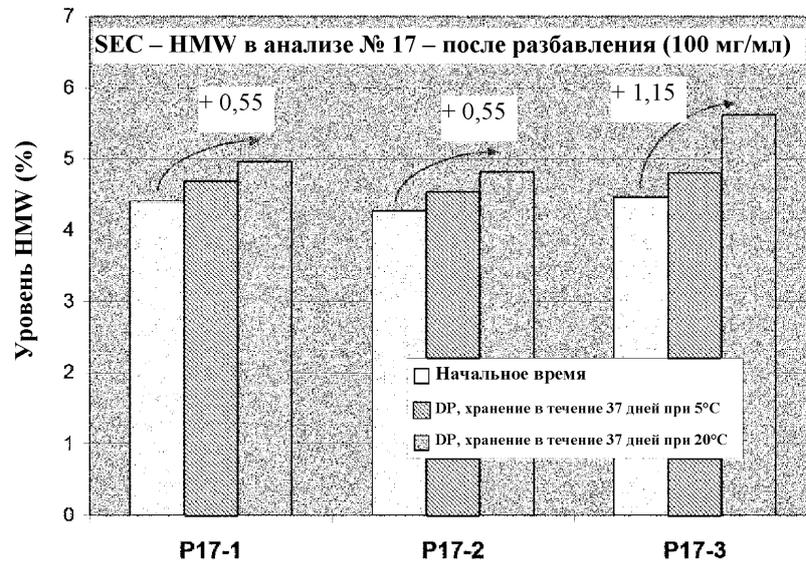
Фигура 22



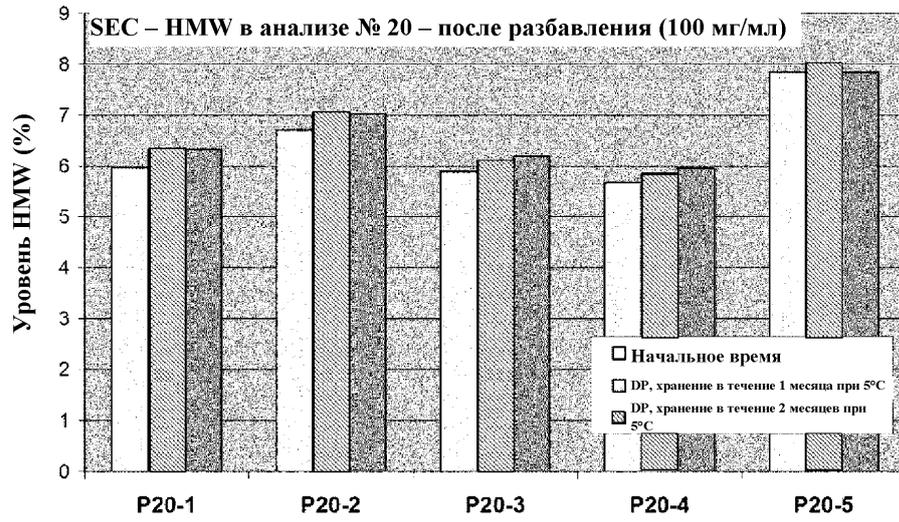
Фигура 23

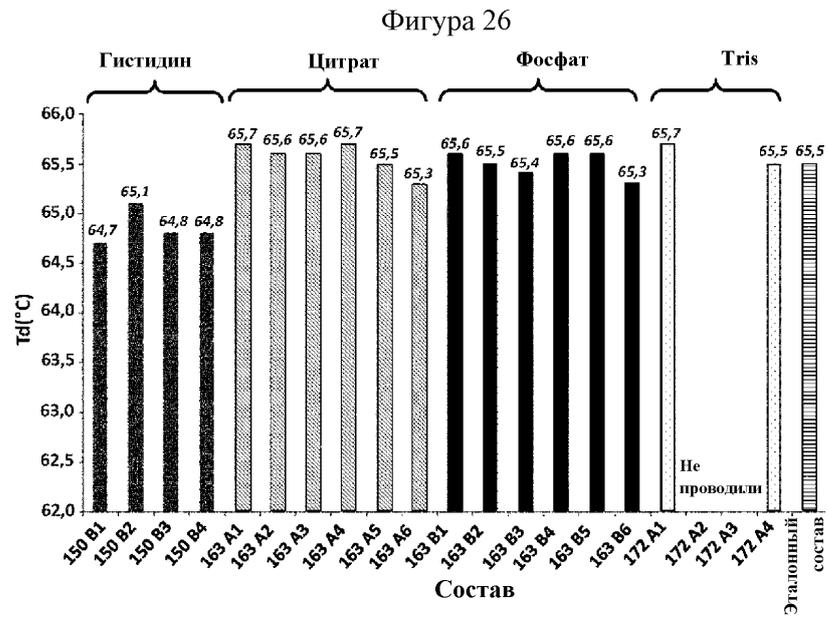


Фигура 24



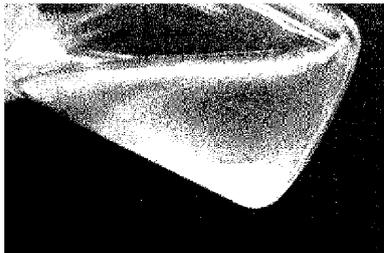
Фигура 25



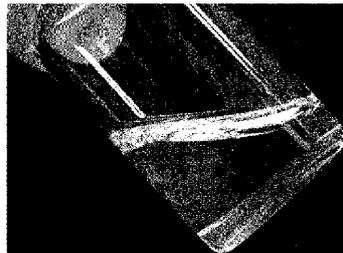


27/37

Фигура 27



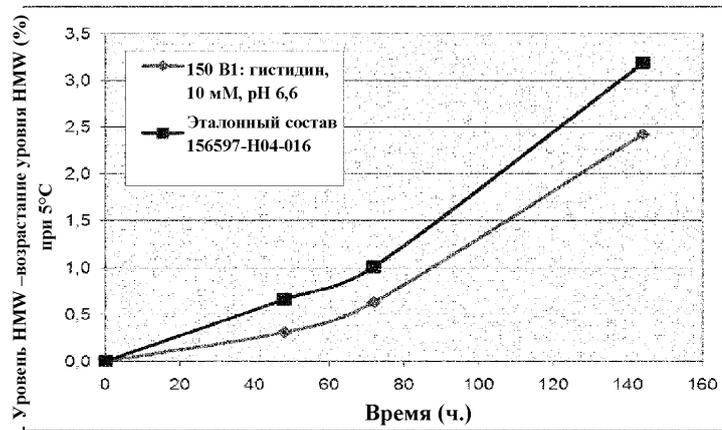
Гистидин, RT



Сукцинат, 5°C

Фигура 28А

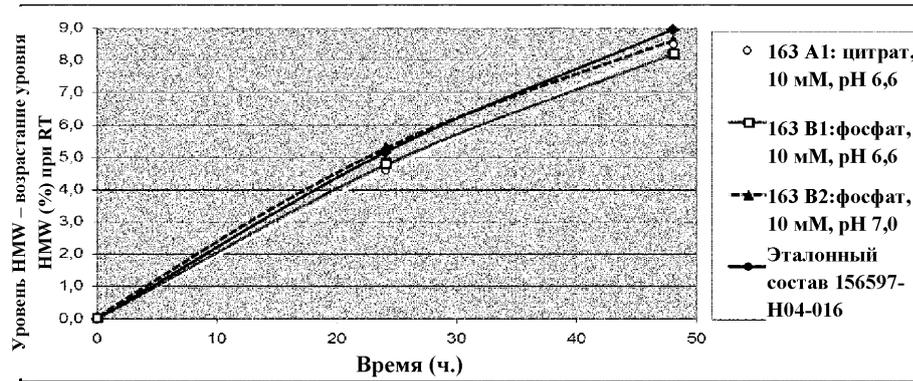
Время (ч.)	Δ НМВ при 5°С	
	150 В1: гистидин, 10 мМ, рН 6,6	Эталонный состав 156597-Н04-016
0	0,0	0,0
48	0,3	0,7
72	0,6	1,0
144	2,4	3,2



29/37

Фигура 28В

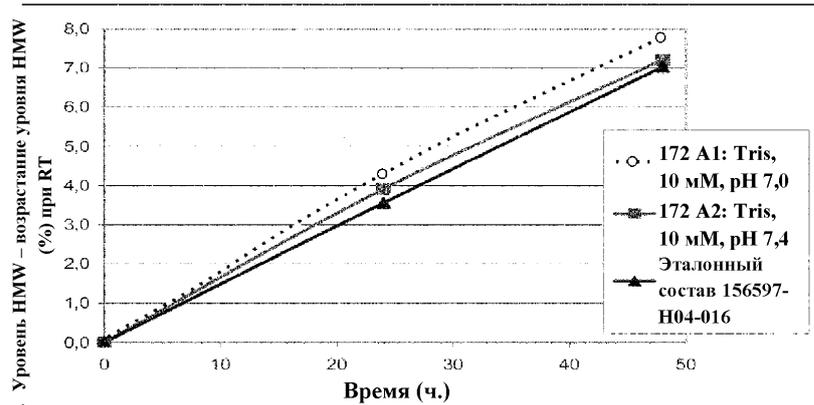
Время (ч.)	Δ НМВ при RT			
	163 А1: цитрат, 10 мМ, рН 6,6	163 В1: фосфат, 10 мМ, рН 6,6	163 В2: фосфат, 10 мМ, рН 7,0	Эталонный состав 156597- Н04-016
0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	4,6	4,8	5,3	5,2
48	8,5	8,2	8,7	9,0



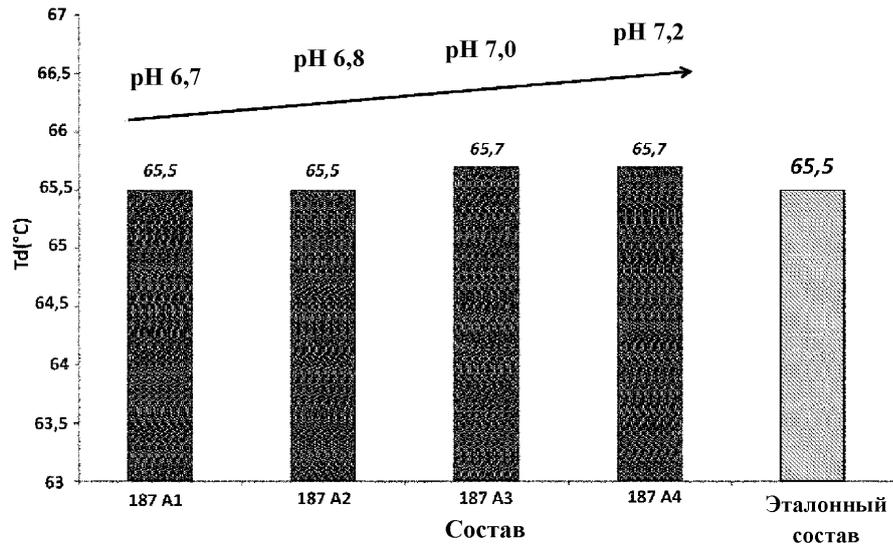
30/37

Фигура 28С

Время (ч.)	Δ НМВ при RT		
	172 А1: Tris, 10 мМ, рН 7,0	172 А2: Tris, 10 мМ, рН 7,4	Эталонный состав 156597- Н04-016
0	0,0	0,0	0,0
24	4,2	3,9	3,6
48	7,8	7,2	7,0

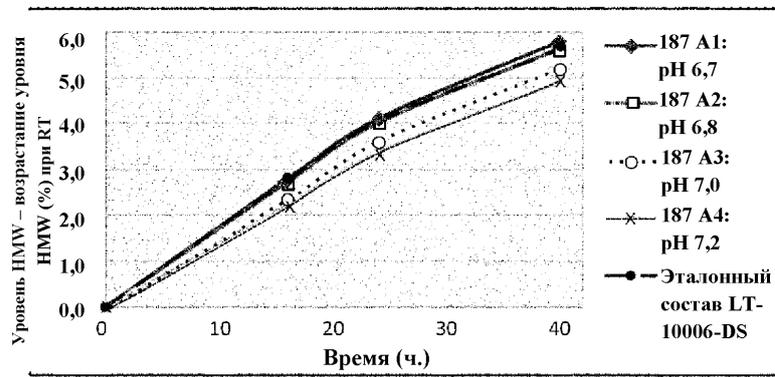


Фигура 29

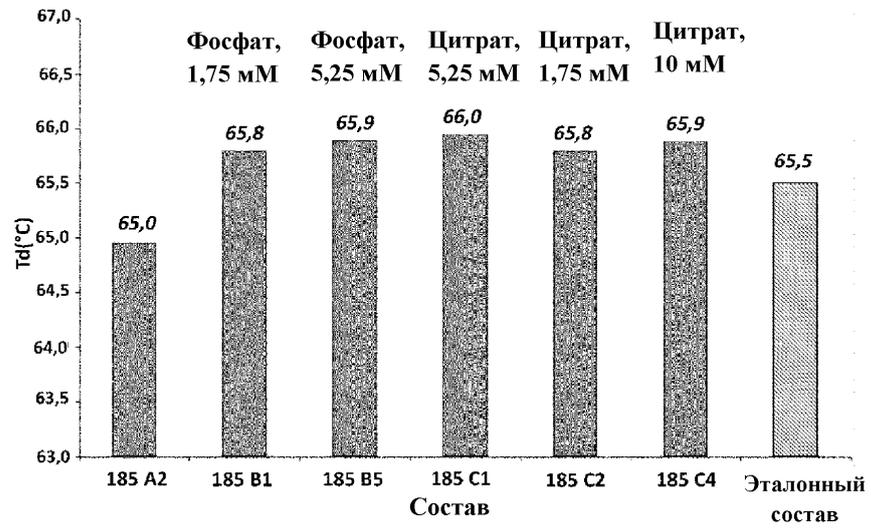


Фигура 30

Время (ч.)	Δ НМВ при RT				
	187 А1: рН 6,7	187 А2: рН 6,8	187 А3: рН 7,0	187 А4: рН 7,2	Эталонный состав LT- 10006-DS
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16	2,8	2,7	2,4	2,2	2,8
24	4,1	4,0	3,6	3,4	4,0
40	5,8	5,7	5,2	4,9	5,6

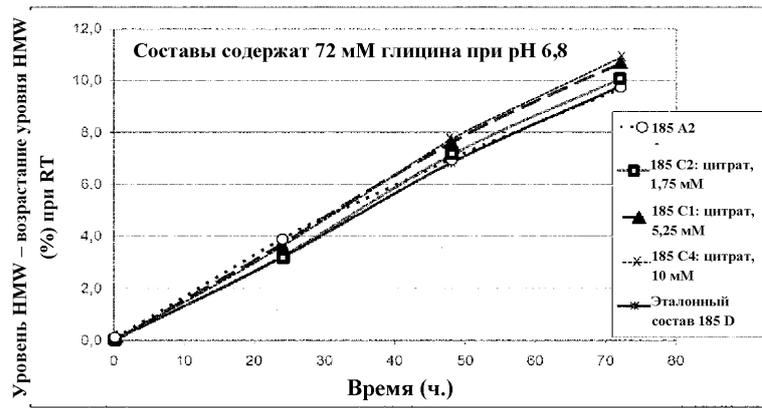


Фигура 31



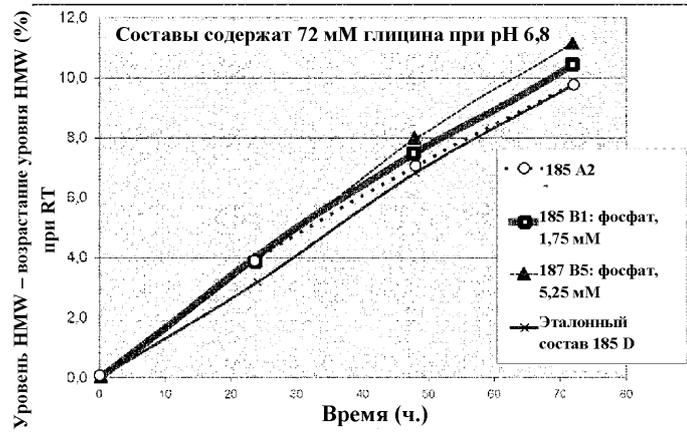
Фигура 32А

Время (ч.)	Δ НМВ при RT				
	185 A2 -	185 C2: цитрат, 1,75 мМ	185 C1: цитрат, 5,25 мМ	185 C4: цитрат, 10 мМ	Эталонный состав 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	3,2	3,8	3,7	3,2
48	7,0	7,1	7,7	7,8	6,8
72	9,8	10,1	10,8	11,0	9,8



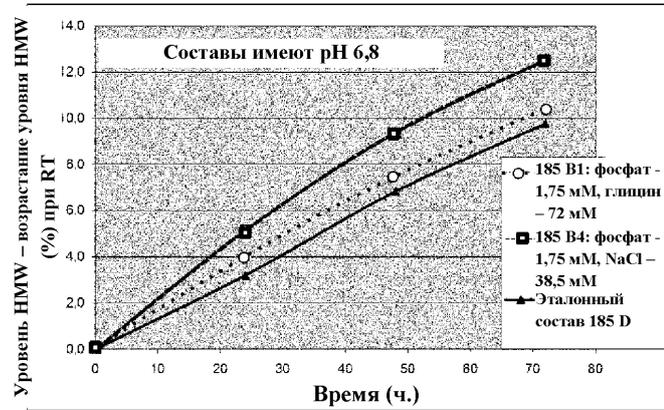
Фигура 32В

Время (ч.)	Δ НМВ при RT			
	185 А2 -	185 В1: фосфат, 1,75 мМ	187 В5: фосфат, 5,25 мМ	Эталонный состав 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	4,0	3,9	3,2
48	7,0	7,5	8,0	6,8
72	9,8	10,4	11,2	9,8



Фигура 33

Время (ч.)	Δ НМВ при RT		
	185 В1: фосфат - 1,75 мМ, глицин – 72 мМ	185 В4: фосфат - 1,75 мМ, NaCl – 38,5 мМ	Эталонный состав 185 D
0	0,0	0,0	0,0
24	4,0	5,2	3,2
48	7,5	9,4	6,8
72	10,4	12,5	9,8



37/37

Фигура 34

Время (ч.)	Δ HMW при RT						
	185 A2 -	185 A1 -	185 B1 Фосфат, 1,75 мМ Глицин, 72 мМ	185 B2 Фосфат, 1,75 мМ Сахароза, 2,4%	185 C2 Цитрат, 1,75 мМ Глицин, 72 мМ	185 C3 Цитрат, 1,75 мМ Сахароза, 2,4%	Эталонный состав 185 D
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	3,9	4,1	4,0	4,2	3,2	4,1	3,2
48	7,0	7,5	7,5	7,5	7,1	7,9	6,8
72	9,8	10,1	10,4	10,4	10,1	10,9	9,8