

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033742**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.21

(21) Номер заявки
201592056

(22) Дата подачи заявки
2014.04.16

(51) Int. Cl. *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ДЛЯ ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ РАСТВОРИМЫЙ Fc-РЕЦЕПТОР, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЛЕКАРСТВЕННУЮ ФОРМУ, И ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) 13002211.4

(32) 2013.04.26

(33) EP

(43) 2016.03.31

(86) PCT/EP2014/001029

(87) WO 2014/173510 2014.10.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗУШПРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Сондерман Петер, Поль Томас (DE)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) US-A1-2008214459
EP-A1-2161031
WO-A1-2007068047
WO-A1-2009158696
WO-A2-2007092772

(57) Изобретение относится к лекарственной форме для подкожного введения для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, инфекций, опухолей и других состояний, в которые вовлечена иммунная система, содержащей растворимый Fcγ-рецептор (sFcγR) в водном забуференном растворе, где концентрация Fcγ-рецептора превышает 60 мг/мл вплоть до 220 мг/мл и где она содержит физиологически приемлемое буферное вещество в эффективном количестве, причем буферное вещество выбрано из гистидина и цитрата, pH лекарственной формы имеет значение от 5,2 до 7,5 и Fc-рецептор представляет собой FcγRIIIb. Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей лекарственную форму, а также к применению лекарственной формы и фармацевтической композиции для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний.

B1

033742

033742

B1

Изобретение относится к новой лекарственной форме для подкожного введения, содержащей растворимый Fc-рецептор и, в частности, к лекарственной форме для подкожного введения, содержащей высокие концентрации растворимого FcγRIIB-рецептора. Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей лекарственную форму, а также к применению лекарственной формы и фармацевтической композиции для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний.

Человеческий растворимый FcγRIIB представляет собой перспективное вещество-кандидат для лечения идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, системной красной волчанки и других аутоиммунных заболеваний. Он представляет собой один из множества растворимых рецепторов антител, которые были разработаны на протяжении последних 10-15 лет.

В WO 00/32767 описаны растворимые Fc-рецепторы (sFcR), которые состоят только из внеклеточной части рецептора и не являются гликозилированными. Из-за отсутствия трансмембранного домена и сигнального пептида данные белки присутствуют в растворимой форме и не связываются с клетками, как это бывает обычно в случае Fc-рецепторов (FcR). Более того, описанные в WO 00/32767 sFcR можно получать рекомбинантным путем, и они были предложены для лечения аутоиммунных заболеваний, вследствие их способности связываться с Fc-частью антител, не оказывая влияния на другие компоненты иммунной системы. В WO 00/32767 дополнительно описана кристаллическая структура определенных sFcR и возможность разработки веществ, которые ингибируют взаимодействие IgG с sFcR, с помощью данных кристаллических структур. Выяснение кристаллической структуры обеспечивает возможность нахождения таких ингибиторов, например, путем скрининга баз данных с помощью доступных компьютерных программ или путем автоматизированной разработки лекарственных средств.

Изобретение, которое было охарактеризовано в WO 03/043648, развивало далее идеи из WO 00/32767 и предусматривало способы лечения заболеваний, в частности рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE) и ревматоидного артрита (RA), а также заболеваний с повышенным уровнем клеток натуральных киллеров (NK). Хотя указанные рецепторы были получены рекомбинантным путем в прокариотах и, следовательно, были негликозилированными, авторы WO 03/043648 обнаружили, что хотя негликозилированные белки, как предполагается, плохо растворимы, эти рецепторы можно было очищать при относительно высоких концентрациях до 50 мг/мл sFcγR в растворимой форме.

WO 00/32767, WO 03/043648 и другие публикации указывают на важную роль FcR в защитных ответах иммунной системы. Когда патогены попадают в кровоток, они связываются иммуноглобулинами, также известными как антитела. Поскольку иммунный ответ на патоген является поликлональным, вырабатывается и связывается с патогеном множество антител, что ведет к образованию иммунного комплекса (IC). Впоследствии IC фагоцитируются специализированными эффекторными клетками (например, фагоцитами или макрофагами) иммунной системы и, таким образом, удаляются из кровотока. Фагоцитоз опосредуется связыванием Fc-части антител, которые вместе с патогеном образуют IC, с FcR на вышеупомянутых эффекторных клетках. Другие эффекторные клетки иммунной системы, такие как натуральные киллеры, эозинофилы и тучные клетки, также несут на своей поверхности FcR, при связывании которых с IC высвобождаются накопленные медиаторы, такие как факторы роста или токсины, которые поддерживают иммунный ответ.

FcR этих эффекторных клеток также функционируют в качестве передающих сигнал молекул, которые специфически связывают иммуноглобулины разных изотипов во время гуморального иммунного ответа. Кроме того, FcR, экспрессируемые на клетках натуральных киллерах, играют важнейшую роль в разрушении покрытых антителами клеток-мишеней ("антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность", ADCC).

Однако, кроме положительных эффектов FcR в защите против патогенов, также могут возникать чрезмерно повышенные ответы, вызванные присутствием аутоантител у пациентов, которые приводят к нежелательной стимуляции иммунной системы, которая проявляется, в частности, в виде воспалительных или аутоиммунных заболеваний. Такие иммунные ответы, направленные против собственных веществ организма, остаются главной медицинской проблемой, и хотя существуют подходы для их лечения, эти подходы не одинаково эффективны для всех пациентов.

Все члены семейства FcγR, т.е. FcR, которые специфичны в отношении антител IgG-типа, представляют собой интегральные мембранные гликопротеины, обладающие внеклеточными доменами, родственными C2-набору иммуноглобулин-связанных доменов, с одним трансмембранным доменом и внутрицитоплазматическим доменом разной длины. Существует три известных формы Fcγ-рецептора, которые обозначаются как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD 16). В предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение, главным образом, сосредоточено на FcγRIII (CD 16).

Белки FcγRII представляют собой 40 кДа интегральные мембранные гликопротеины, которые связывают только образовавшие комплекс IgG в составе IC. Эти рецепторы, наиболее широко экспрессируемые FcγR, присутствуют на всех гемопоэтических клетках, в том числе моноцитах, макрофагах, В-клетках, NK-клетках, нейтрофилах, тучных клетках и тромбоцитах. Существуют три человеческих гена FcγRII (FcγRII-a, FcγRII-b, FcγRII-c), продукты всех из них связывают IgG в агрегатах или иммунных комплексах.

Воспаление представляет собой процесс, при помощи которого лейкоциты организма реагируют на инфицирование чужеродными веществами, такими как бактерии и вирусы. Оно обычно характеризуется болью, отеком, повышенной температурой и покраснением пораженной ткани. Эффекторное вещество, известные как цитокины и простагландины, контролируют этот процесс и высвобождаются в виде упорядоченного и самоограничивающегося каскада в кровь или пораженные ткани. Высвобождение таких эффекторных веществ увеличивает приток крови к области повреждения или инфицирования. Некоторые из эффекторных веществ вызывают просачивание жидкости в ткани, что приводит к отеку. Этот защитный процесс может стимулировать нервные окончания и вызывать боль. Эти изменения, если они происходят в течение ограниченного периода времени в соответствующей области, приносят организму пользу.

При аутоиммунных заболеваниях иммунная система пациента утрачивает способность различать принадлежащие организму ("свои") и чужеродные белки. В результате вырабатываются антитела, которые распознают "свои" белки и образуют иммунные комплексы, которые непрерывно активируют иммунную систему, поскольку "свой" белок постоянно вырабатывается и распознается как чужеродный. Это хроническое состояние может сохраняться в течение многих лет, что ведет, в конце концов, к тяжелым повреждениям органов и, возможно, к смерти пациента. Существует много различных аутоиммунных расстройств, которые поражают организм различными способами. Например, головной мозг поражается у индивидуумов с рассеянным склерозом, кишечник поражается у индивидуумов, имеющих болезнь Крона, а синовиальная оболочка, кость и хрящ различных суставов поражаются у индивидуумов, страдающих от ревматоидного артрита. По мере прогрессирования аутоиммунных расстройств может происходить разрушение одного или нескольких типов тканей организма, аномальный рост органа или изменения в функции органа. Аутоиммунное заболевание может поражать один орган или тип ткани или может поражать несколько органов и тканей. Органы и ткани, обычно поражаемые при аутоиммунных расстройствах, включают эритроциты, кровеносные сосуды, соединительные ткани, эндокринные железы (например, щитовидную железу или поджелудочную железу), мышцы, суставы и кожу.

Примеры воспалительных и/или аутоиммунных расстройств включают, но без ограничений, первичную иммунную тромбоцитопению (ITP), системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA), аутоиммунную гемолитическую анемию (АНА), сахарный диабет, обыкновенную пузырчатку, тиреоидит Хашимото, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, миастению, пернициозную анемию, болезнь Аддисона, дерматомиозит, синдром Шегрена, дерматомиозит, рассеянный склероз, синдром Рейтера, болезнь Грейвса, аутоиммунный гепатит, семейный аденоматозный полипоз и язвенный колит.

Fc γ R можно разделить на два основных класса в соответствии с их функцией, которая может быть активирующей или ингибирующей. Для активирующих рецепторов характерен цитоплазматический имунорецепторный тирозинсодержащий активационный мотив (ITAM) из 16 аминокислот с консенсусной последовательностью Y-X₂-L/I-X₆₋₁₂-Y-X₂-I/L (Barrow and Trowsdale, *EuJI*, 2006, 36: 1646-1653). Этот мотив можно обнаружить, например, в Fc γ RIIA. Другим классом FcR являются ингибиторные рецепторы, которые содержат ингибиторный мотив (ITIM) из 6 аминокислот в цитоплазматической части рецептора с консенсусной последовательностью S/I/V/L-X-Y-X₂-I/V/L (Barrow and Trowsdale, *EuJI*, 2006, 36: 1646-1653). Примером такого ингибиторного FcR является Fc γ RIIB.

Fc γ RIIB (Fc γ RIIB) характеризуется двумя ингибиторными активностями. Одна из них зависит от ITIM мотива и наблюдается, когда Fc γ RIIB лигируется с рецептором, несущим ITAM-мотив (например Fc γ RIIA), что приводит к ингибированию ITAM-запускаемой мобилизации кальция и пролиферации клетки. Второй ингибиторный механизм Fc γ RIIB предусматривает гомоагрегацию рецептора (кластеризацию Fc γ RIIB), что передает проапоптотический сигнал в цитоплазму. О проапоптотическом сигнале сообщали только для В-клеток, и он может блокироваться лигированием Fc γ RIIB с В-клеточным рецептором (BCR) (J.V. Ravetch, S. Bolland, *Annu Rev. Immunol.* 2001; 19:275-90).

Как упоминалось выше, в WO 03/043648 уже было описано применение sFc γ RIIB в фармацевтических препаратах, где относительно большие количества Fc γ -рецепторов можно было включать в приемлемый объем раствора для лечения, например, для инъекции в пациента. Растворимые Fc γ -рецепторы и, в частности, sFc γ RIIB были предложены для лечения аутоиммунных заболеваний, поскольку они могут связываться с антителами, но не воздействуют на другие компоненты иммунной системы. Таким образом, растворимые Fc-рецепторы способны нейтрализовать антитела в кровяном русле, что оказывает эффект ослабления, в частности на аутоиммунные процессы. Возможные показания, которые уже упоминались в WO 03/043648, предусматривают растворимые Fc γ -рецепторы для лечения рассеянного склероза (MS), системной красной волчанки (SLE) и ревматоидного артрита (RA), а также для заболеваний с повышенным уровнем НК-клеток, чтобы избежать недостатков ранее применяемых способов лечения таких заболеваний.

Раскрытие WO 03/043648 сосредоточено на обнаруженном в этом документе факте, что растворимые Fc-рецепторы можно применять для получения водных растворов с концентрацией до 50 мг/мл растворимого рецептора. В случае определенных применений таких концентраций активного средства является вполне достаточно. В последних исследованиях, однако, было установлено, что терапевтическая доза sFcR, например sFc γ RIIB, значительно больше 1 мг/кг массы тела пациента, является благоприятной

или даже необходимой для успешного лечения аутоиммунных заболеваний.

Подкожное введение лекарственных препаратов считается эффективным, а также относительно несложным и необременительным способом доставки активного средства пациенту. По сравнению с внутривенной инфузией, для которой требуется более обширное медицинское оборудование и, в большинстве случаев, введение в кабинете врача или в больнице, подкожное введение с легкостью может осуществлять даже сам пациент. Подкожное введение также будет приводить к замедленному началу действия, т.е. увеличенному времени полувыведения и времени достижения максимальной концентрации. Кроме того, было установлено, что в случае подкожной доставки максимальная концентрация в плазме снижается. Эти эффекты основаны на введении под кожу пациента, откуда активное средство транспортируется в кровяное русло. Белки размером больше приблизительно 16-20 кДа, как обычно полагают, захватываются преимущественно лимфатической системой, что может быть преимуществом для Fc γ R, поскольку целевая популяция В-клеток также созревает и локализована в лимфатических сосудах (Porter, S.J.H. and Charman, S.A. (2000), *J. Pharm Sci.* 89, 297-310).

Подкожный путь введения, однако, предпочтительно ограничен объемом инъекции в 1,0 мл, возможно до 1,5 мл, за одно введение (Gatlin L.A. and Gatlin C.A.B. (1999), Gaipa P.K. & Brazeau G.A., eds., Interpharm Press, Denver, pp. 401-425). Таким образом, водные растворы sFc γ R, известные из WO 03/043648, не могли рекомендоваться для подкожного введения. Напротив, исходя из раскрытия этого документа, в случае достаточно высоких концентраций рецептора следует ожидать выпадения в осадок и образования нежелательно крупных кристаллов рецепторов в водном растворе и, соответственно, засорения игл и/или боли в месте инъекции. Следовательно, несмотря на все ожидаемые преимущества, подкожное введение не оказалось многообещающим путем для лечения и, скорее, внутривенная инъекция или инфузия, казалась единственным приемлемым способом доставки.

Соответственно, одной целью настоящего изобретения было обеспечение средств и условий для менее сложного и тяжелого введения Fc-рецепторов пациенту, а также лекарственных форм для подкожного введения, содержащих растворимые Fc-рецепторы, в частности растворимые Fc γ RIIB, которые содержат рецептор с достаточно высокой концентрацией, чтобы обеспечить возможность подкожной схемы лечения аутоиммунных заболеваний.

Еще одной целью настоящего изобретения было обеспечение таких лекарственных форм для подкожного введения, содержащих высококонцентрированный растворимый Fc-рецептор в готовой к применению форме, которая является устойчивой при обычных условиях хранения лекарственных препаратов на протяжении более 24 месяцев, или, в качестве альтернативы, в форме, которая предусматривает долгосрочное хранение, а также легкое и простое доведение и восстановление перед использованием в виде подкожного применения.

Согласно настоящему изобретению решением этих целей стала лекарственная форма для подкожного введения для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, инфекций, опухолей и других состояний, в которые вовлечена иммунная система, содержащая растворимый Fc γ -рецептор (sFc γ R) в водном забуференном растворе, где концентрация Fc γ -рецептора превышает 60 мг/мл вплоть до 220 мг/мл и где она содержит физиологически приемлемое буферное вещество в эффективном количестве, причем буферное вещество выбрано из гистидина и цитрата, pH лекарственной формы имеет значение от 5,2 до 7,5, и Fc-рецептор представляет собой Fc γ RIIB.

Согласно одному варианту осуществления представлена лекарственная форма, где концентрация Fc γ -рецептора превышает 80 мг/мл, предпочтительно превышает 100 мг/мл, более предпочтительно превышает 150 мг/мл и наиболее предпочтительно превышает 200 мг/мл.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, содержащая дополнительные вещества, выбранные из сахаров, солей и детергентов.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, где рецептор присутствует в растворенной форме.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, представляющая собой забуференный цитратом раствор, и pH имеет значение от 6,0 до 7,5.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, представляющая собой забуференный гистидином раствор, и pH имеет значение от 5,2 до 5,9.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, содержащая рецептор в кристаллической форме.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, представляющая собой забуференный цитратом раствор, и pH имеет значение от 5,2 до 5,9.

Согласно другому варианту осуществления представлена лекарственная форма, представляющая собой забуференный гистидином раствор, и pH имеет значение от 6,0 до 7,5.

В другом аспекте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей лекарственную форму согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту осуществления представлена фармацевтическая композиция, где указанная лекарственная форма присутствует в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполните-

лями, и/или вспомогательными веществами, и/или носителями.

Согласно еще одному варианту осуществления представлена фармацевтическая композиция, предназначенная для подкожной инъекции эффективного количества Fc γ -рецептора для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, инфекций, опухолей и других состояний, в которые вовлечена иммунная система.

В другом аспекте осуществления настоящее изобретение относится к применению лекарственной формы согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичная иммунная тромбоцитопения или аутоиммунная гемолитическая анемия.

В еще одном аспекте осуществления настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичная иммунная тромбоцитопения или аутоиммунная гемолитическая анемия. В ходе исследования, которое привело к настоящему изобретению, было обнаружено, что вопреки предыдущим ожиданиям возможно обеспечение растворимых Fc-рецепторов, растворенных в подходящих буферных растворах, при концентрации даже намного выше 70 мг/мл и предпочтительно больше 150 мг/мл, в результате чего впервые стало возможным получение sFcR также в виде фармацевтической композиции для подкожного применения. Подкожное применение как парентеральный способ применения является более простым и быстрым в применении, чем внутривенный способ применения. Как уже упоминалось выше, даже сам пациент может выполнять подкожное применение.

Для подкожного введения требуется короткая и обычно тонкая канюля. В составе лекарственной формы с высокой концентрацией по настоящему изобретению предусмотрены sFcR в полностью растворенной и гомогенной форме, обладающие приемлемой вязкостью, что допускает применение этих тонких канюль, или в виде суспензии кристаллов, содержащей кристаллы, которые достаточно малы, чтобы пройти через эти тонкие канюли. Таким образом, значительно возрастает комфорт пациента и введение рецепторов можно осуществлять подкожным путем.

Лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению, как описано ниже, обеспечивают возможность получения растворимых FcR и, в частности, растворимых Fc γ RIIB, в концентрациях вплоть до максимального значения, которое ограничивается, в основном, увеличением вязкости раствора из-за высокой концентрации Fc-рецептора. При выборе соответствующих буферных веществ и доведения подходящей осмоляльности в рамках настоящего изобретения обеспечена возможность стабилизации 220 мг/мл sFc γ RIIB и более при физиологическом pH.

Физиологически приемлемые буферные вещества, которые применяют согласно настоящему изобретению, представляют собой традиционно применяемые буферы для фармацевтического применения подходящих растворов. В рамках настоящего изобретения, однако, было обнаружено, что значение pH раствора, зависящее от применяемого буферного вещества, оказывает значительное влияние на растворимость Fc-рецепторов. Значение pH, зависящее от выбранного буфера, должно доводиться в пределах определенного диапазона и, в частности, до конкретного оптимума для достижения требуемой растворимости Fc-рецепторов, в частности, если целью является получение лекарственной формы для подкожного введения, которая не содержит сколько-нибудь кристаллического sFcR.

Кроме того, было обнаружено, что белок сам по себе способен в достаточной степени служить в качестве буфера из-за присутствия положительно и отрицательно заряженных аминокислот. Таким образом, например, путем выбора соответствующего значения pH, основанного на значениях pK боковых остатков аминокислот белков, возможен отказ от добавления отдельного буферного вещества при условии, что в растворе присутствует подходящее количество белка, чтобы действовать в качестве физиологически приемлемого буферного вещества.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве буферного вещества лекарственная форма для подкожного введения содержит что-либо из гистидинового буфера, цитратного буфера или фосфатного буфера. Однако особенно предпочтительно готовить лекарственную форму либо с гистидиновым, либо с цитратным буфером. В обоих случаях было обнаружено, что доведение значения pH в этих забуференных растворах обеспечивает регуляцию растворимости Fc-рецепторов, при помощи чего можно растворять высокие концентрации Fc-рецептора, впрочем, также можно вызывать кристаллизацию при помощи увеличения или уменьшения величины pH в зависимости от применяемого буферного вещества. Эта возможность перехода между растворимой и кристаллической формами sFcR с помощью простой регуляции значения pH предполагает значительные преимущества с точки зрения адаптации, касающихся применимости фармацевтических композиций, их сохранности и устойчивости при хранении.

Например, во время процедур регистрации лекарственных препаратов должна быть доказана их достаточная устойчивость при хранении. В данном контексте необходимо, чтобы для партии, на основании которой запрашивают разрешение на регистрацию, были включены данные об устойчивости при хранении в течение по меньшей мере 12 месяцев при температуре 5°C. Однако желательно и предпочтительно,

чтобы при соответствующих условиях достигалась устойчивость при хранении в течение более 24 месяцев, при этом с учетом упомянутых условий хранения значительное количество, предпочтительно 90%, фармацевтического средства все еще должно присутствовать в активной форме после истечения данного времени.

В данном контексте лекарственные формы для подкожного введения по изобретению демонстрируют конкретные преимущества. Например, с помощью них обеспечивается возможность продажи лекарственных форм с высокой концентрацией sFcR в жидкой форме, которые содержат исключительно растворенный Fc-рецептор и которые демонстрируют высокую устойчивость при хранении.

Кроме того, лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению можно подвергать лиофилизации для получения твердой формы хранения. Такие твердые формы могут демонстрировать даже повышенную устойчивость при хранении по сравнению с жидкими лекарственными формами. Следовательно, такие лекарственные формы для подкожного введения представляют собой еще один объект по настоящему изобретению.

Лиофилизацию можно проводить любым подходящим способом, известным специалисту по лиофилизации белков. Во избежание разрушения белков предпочтительным является применение наиболее мягких условий.

Из твердой формы легко можно восстановить готовые к применению жидкие лекарственные формы путем добавления воды для инъекций, солевого или забуференных водных растворов с получением Fc-рецептора снова в полностью растворенной форме, или могут быть выбраны промежуточные стадии, в которых растворимость регулируют по желанию.

Также еще один объект настоящего изобретения представляют собой концентрированные лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению. Такие концентрированные формы можно получать, например, при помощи удаления части жидкости ниже предела растворимости, в результате чего образуются лекарственные формы, содержащие, по меньшей мере, некоторое количество рецепторов в кристаллической форме. Также из таких лекарственных форм sFcR можно восстанавливать в виде готовых к применению жидких лекарственных форм при помощи добавления воды для инъекций, солевого или забуференных водных растворов до требуемой концентрации активного sFcR и, в частности, до концентраций, при которых sFcR присутствует в полностью растворенной форме.

Вследствие зависимости растворимости Fc-рецептора от значения pH в лекарственных формах для подкожного введения согласно настоящему изобретению, эти лекарственные формы обеспечивают дополнительное преимущество, поскольку на практике можно вызывать кристаллизацию Fc-рецептора исключительно путем регуляции pH, и его можно получать (например, после осаждения или центрифугирования) в виде концентрированной суспензии кристаллов. Кристаллы, которые можно получать таким образом, могут быть очень маленькими (микрочастицы), в частности в зависимости от условий кристаллизации. Чем быстрее происходит кристаллизация, тем меньшими размерами характеризуются кристаллы. В отличие от известного уровня техники настоящее изобретение допускает быстрое и почти количественное преобразование растворенного sFcR в микрочастицы белка и наоборот и, таким образом, обеспечивает возможность варьирования свойств растворимости соответствующих растворов и составов. Это является дополнительной возможностью для обеспечения превосходной устойчивости при хранении и, в частности, потребности в крайне небольшом пространстве для хранения активного средства, которое затем можно преобразовать в полностью или преимущественно растворимую форму с помощью растворения в подходящем забуференном водном растворе с подходящим значением pH. Например, это можно выполнить непосредственно перед его применением в качестве лекарственного препарата с помощью смешивания концентрированной суспензии кристаллов с подходящим буфером. В качестве альтернативы суспензию или состав с микрочастицами можно напрямую вводить путем подкожного применения, поскольку в настоящем изобретении предусмотрены средства для преобразования рецептора в микрочастицы, то есть кристаллы, которые достаточно малы, чтобы пройти через канюлю или тонкую иглу. По сравнению с высококонцентрированными жидкими составами вязкость таких суспензий микрочастиц намного ниже и не возрастает экспоненциально с увеличением концентрации белка.

Для целей настоящего изобретения и как используется выше в контексте описания настоящего изобретения, Fc-рецепторы считаются "кристаллическими", если кристаллы имеют средний размер более 500 нм в диаметре, тогда как микрочастицы содержат микрочастицы с размером, который равен или меньше 500 нм в диаметре.

Настоящее изобретение обеспечивает возможность нового пути получения растворимых Fc-рецепторов при высоких концентрациях в разных формах, подходящих для немедленного или последующего фармацевтического применения. Как показано выше, это можно осуществлять в виде готовой к применению растворенной формы, или в виде твердой, например, лиофилизированной формы, получаемой из такого раствора, или в виде микрочастицы формы, осажденной при помощи регуляции значения pH, которую затем можно восстанавливать путем повторного растворения, так что образуется лекарственная форма, в которой Fc-рецептор содержится с высокой концентрацией в подходящем забуференном растворе при требуемом значении pH.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения в качестве Fc-рецептора

лекарственная форма для подкожного введения по настоящему изобретению содержит sFc γ -рецептор. Принимая во внимание возможность лечения аутоиммунных заболеваний, следует рассматривать sFc γ RII-рецепторы и, в частности, sFc γ RIIB. Наиболее предпочтительная лекарственная форма по настоящему изобретению, таким образом, содержит растворимый Fc γ RIIB-рецептор в виде фармацевтически применимого раствора с подходящим буферным веществом.

Для целей настоящего изобретения Fc γ RIIB-рецептор имеет последовательность, описываемую в известном уровне техники, в частности, в WO 00/32767 и WO 03/043648 или других документах, относящихся, в частности, к Fc γ RIIB и, в частности, к sFc γ RIIB. Кроме того, подразумевается, что этот термин охватывает формы рецептора, которые могут отличаться, в частности, своими N-концевыми частями. Особенно предпочтительный белок sFc γ RIIB показан в SEQ ID NO:1. Эта последовательность содержит метиониновый остаток на N-конце, который, например, необходим для экспрессии в прокариотах, однако, отщепляется у большинства полученных белков при помощи бактериальных механизмов позднее. Следовательно, белки согласно SEQ ID NO:1, не имеющие N-концевого метионина, также охвачены настоящим изобретением, также как и смеси белков с N-концевым Met и без него. Кроме того, в зависимости от способа получения и состояния бактериального штамма-производителя могут происходить дополнительные изменения в пяти N-концевых аминокислотах. Например, кроме метионина также могут отщепляться следующие остатки, или метионин может замещаться другой аминокислотой, например норлейцином. Следовательно, настоящим определением sFc γ RIIB и, в частности, термином husFc γ RIIB охватываются также смеси всех этих белков, отличающихся N-концом и происходящих из способов получения с применением ДНК-последовательности, которая кодирует аминокислотную последовательность с SEQ ID NO:1.

В других предпочтительных вариантах осуществления считается, что белки Fc γ RIIB охвачены настоящим изобретением при условии, что они характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью с белком с SEQ ID NO:1. Для определения идентичности последовательности сравнение выполняется путем выравнивания последовательностей таким образом, чтобы обеспечить максимальное соответствие аминокислот. Особенно предпочтительно, чтобы отличия в заявленных белках встречались только в пределах первых десяти и, наиболее предпочтительно, в пределах первых пяти аминокислот. Особенно предпочтительно, чтобы белки характеризовались по меньшей мере 95% аминокислотной идентичностью, при этом отличия встречались в пределах первых пяти аминокислот в SEQ ID NO:1, где отличия в аминокислотах обусловлены по меньшей мере одним из делеций, замен и дополнений.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления эта лекарственная форма согласно настоящему изобретению содержит sFc-рецептор и, в частности, sFc γ RIIB-рецептор при концентрации, превышающей 60 мг/мл, более предпочтительно превышающей 60-80 мг/мл, еще более предпочтительно превышающей 80 мг/мл, даже еще более предпочтительно превышающей 100 мг/мл и, особенно предпочтительно, превышающей 150 мг/мл и, наиболее предпочтительно, даже превышающей 200 мг/мл.

Лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению необязательно содержат дополнительные фармацевтически приемлемые вещества, которые применяются, например, для доведения ионной силы раствора и/или способствуют растворимости и устойчивости содержащегося в нем белка-рецептора. Такие вещества известны специалисту в данной области. Для доведения ионной силы лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению необязательно содержат соль и, предпочтительно, NaCl. Для стабилизации белка можно применять полиолы и, в частности, сахара и сахароспирты, такие как сахароза или маннит. Кроме того, лекарственная форма для подкожного введения по настоящему изобретению предпочтительно содержит детергенты, которые подходят для фармацевтических применений, например, полисорбаты.

Буферные вещества, предпочтительно, содержатся в лекарственной форме для подкожного введения по настоящему изобретению в количестве от 0,1 мкМ до 300 мМ. В более предпочтительных вариантах осуществления физиологически приемлемый буфер присутствует в количестве от 0,1 до 150 мМ и, в частности, от 1 до 50 мМ.

Для доведения осмоляльности (изотоничности) подходят соли, такие как хлорид натрия, в таких количествах, которые доводят до предпочтительно физиологической осмоляльности, по меньшей мере при условии, что лекарственная форма предназначена для непосредственного введения пациенту. Осмоляльность раствора можно доводить в широком диапазоне и можно установить в диапазоне от 10 мОсм/кг до более 600 мОсм/кг без значительного воздействия на растворимость Fc-рецептора.

Соль, предпочтительно NaCl, присутствует в лекарственной форме для подкожного введения в концентрации от приблизительно 0 до 250 мМ, предпочтительно от 5 до 200 мМ и наиболее предпочтительно от 10 до 50 мМ.

Полиолы, такие как сахароза, необязательно содержатся в лекарственных формах для подкожного введения по настоящему изобретению, однако в предпочтительных вариантах осуществления они присутствуют в количестве, составляющем по меньшей мере 1,0% и, более предпочтительно, по меньшей мере 2,0%. Предпочтительный верхний предел содержания полиолов составляет приблизительно 25%, более предпочтительно 15% и наиболее предпочтительно 8%. Сахара, как известно, стабилизируют бел-

ки в растворе.

Соли и сахара необходимо сбалансировать для регуляции осмоляльности раствора, предпочтительно, чтобы он был изотоническим. Чем больше сахара содержится в растворе, тем меньше соли можно добавлять, и наоборот.

Подходящие количества детергентов, которые, предпочтительно, применяют в контексте настоящего изобретения, составляют 0,001-0,1%, в частности 0,005-0,05%.

Как уже упоминалось выше, данные, которые были получены в рамках настоящего изобретения, предусматривают регуляцию условий растворимости для растворимых Fc-рецепторов и, в частности sFcγRIIB, так, что в случае содержания Fc-рецептора, превышающего 50 мг/мл, возможно получение заранее определенного количества рецепторов как в полностью растворенной форме, так и в микрокристаллической форме для введения пациенту. Как также упоминалось выше, для введения пациенту зачастую преимущественным является получение как можно более высокой концентрации в полностью растворенной форме или, по меньшей мере, в форме, которую можно преобразовать в растворенную.

В случае лекарственных форм для подкожного введения, содержащих микрокристаллические sFcR, введение пациенту также возможно, при этом микрокристаллы полностью растворяются после введения, и активное вещество становится доступным и оказывает свое физиологическое воздействие. В случае других типов введения и также в случае хранения преимуществом скорее может быть поддержание рецептора в кристаллической форме, в которой он особенно устойчив к разрушению и, таким образом, защищен от потери активности.

Соответственно, предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой лекарственные формы для подкожного введения, которые являются полностью жидкими и где рецептор представлен в растворенной форме или в виде подходящей микрокристаллической формы.

Особенно предпочтительная лекарственная форма для подкожного введения по настоящему изобретению содержит растворимый FcγRIIB-рецептор в забуференном цитратом растворе и имеет значение pH, которое равно или превышает 6. Значение pH предпочтительно доводят в пределах диапазона 6,0-7,5. В таких забуференных цитратом растворах с физиологическим значением pH FcγRIIB-рецептор растворим при концентрациях, превышающих 140 мг/мл. Вследствие физиологического значения pH такая лекарственная форма для подкожного введения также имеет то преимущество, что его можно напрямую вводить пациенту, при этом она не вызывает побочных эффектов, например, боли в месте введения.

В другом предпочтительном варианте осуществления растворимый FcγRIIB-рецептор содержится в забуференном гистидином растворе со значением pH 5,2-5,9. При применении гистидинового буфера sFcγRIIB растворим при концентрациях больше 100 мг/мл.

При значении pH приблизительно 6,0 растворимость рецептора все еще остается относительно высокой, однако начинает образовываться осадок из кристаллов, тогда как при более высоком pH наблюдается только значительно более низкая растворимость рецептора.

Обе описанные выше лекарственные формы для подкожного введения обеспечивают возможность высокой концентрации растворенного sFcγRIIB-рецептора вплоть до значения приблизительно 220 мг/мл, которое ограничивается вязкостью, причем это может быть показано как в случае упомянутого забуференного цитратом раствора, так и в случае забуференного гистидином раствора (см. прилагаемые примеры).

Лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению дополнительно обладают отличными свойствами устойчивости при замораживании/оттаивании, а также отличной устойчивостью при пониженных температурах от 2-8°C. Этих растворы обладают отличной устойчивостью даже при комнатной температуре.

Оба раствора применимы как для прямого введения пациенту, так и для получения лиофилизированной или высококонцентрированной лекарственной формы, которая может содержать кристаллы, а также удобна для хранения или приготовления растворов для инъекций, которые может восстанавливать непосредственно пациент.

Для прямого введения, как уже упоминалось выше, особенно предпочтителен забуференный цитратом раствор с физиологическим значением pH.

Особенно предпочтительным еще одним объектом настоящего изобретения является лекарственная форма для подкожного введения, которая содержит рецептор в кристаллической форме. Такие лекарственные формы предпочтительно реализованы в виде забуференной цитратом суспензии со значением pH 5,2-5,9 или, в качестве альтернативы, в виде забуференной гистидином суспензии со значением pH 6,0-7,5. Такие суспензии можно предпочтительно применять, например, в качестве устойчивых при хранении форм, которые для введения пациенту можно преобразовать в лекарственную форму для подкожного введения, содержащую высокие концентрации растворенного рецептора, при помощи доведения pH. Кроме того, их также можно концентрировать или из них можно получать рецептор путем отделения раствора с получением высококонцентрированной суспензии кристаллов. Рецептор можно восстанавливать в полностью растворенной форме путем разбавления в подходящем буфере при подходящем значении pH.

Описанные лекарственные формы для подкожного введения по настоящему изобретению и те данные, что при применении определенных буферных веществ, оказывающих влияние на значение pH, можно реализовать разные уровни растворимости Fc-рецепторов, обеспечивают возможность, с одной стороны, получения готовых к применению инъекций для подкожного введения пациенту или, с другой стороны, получение особенно устойчивых при хранении вариантов, содержащих кристаллический Fc-рецептор. Предусмотрены даже лиофилизированные или иным образом полученные твердые формы рецептора, которые простым добавлением подходящих растворов можно преобразовать в готовые к применению формы, содержащие высокие концентрации растворимого рецептора.

Таким образом, еще один объект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит лекарственную форму для подкожного введения по настоящему изобретению, как описано выше, и в которой могут присутствовать дополнительные фармацевтически приемлемые наполнители, и/или вспомогательные вещества, и/или носители. В особенно предпочтительных вариантах осуществления эти фармацевтические композиции можно применять напрямую для подкожной инъекции эффективного количества растворимого Fc-рецептора и, в частности, для лечения аутоиммунных заболеваний.

В одном предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция предпочтительно содержит достаточное количество полностью растворенного sFc-рецептора в подходящем буферном веществе и при физиологическом значении pH. Такая фармацевтическая композиция представляет собой готовый к применению медикамент, и его можно напрямую вводить пациенту. Растворенный растворимый рецептор, к примеру, может легко всасываться в лимфатическую систему пациента и может напрямую действовать в ней, или после транспортировки в организме пациента при помощи крови или циркуляции биологических жидкостей.

В качестве альтернативы, фармацевтическая композиция может содержать рецептор в высококонцентрированной и, по меньшей мере, частично микрокристаллической или кристаллической форме. Фармацевтическая композиция, при необходимости разведенная с помощью подходящих буферных растворов, также особенно подходит для подкожной инъекции эффективного количества Fc-рецепторов.

Как уже объяснялось выше в контексте описания настоящего изобретения, Fc-рецепторы считаются "кристаллическими", если кристаллы имеют средний размер более 500 мкм в диаметре, тогда как микрокристаллические формы содержат кристаллы с размером, который равен или меньше 500 мкм в диаметре. При условии, что рассматривается введение пациенту напрямую, конечно, можно применять фармацевтические композиции, содержащие полностью растворенный Fc-рецептор, но также фармацевтические композиции, содержащие лекарственные формы для подкожного введения с Fc-рецептором, находящимся исключительно или частично в микрокристаллической форме, могут находить фармацевтическое применение. Эти микрокристаллы являются достаточно маленькими, чтобы не забивать иглы для подкожного применения. Применение растворов, содержащих микрокристаллы, может иметь преимущество, например, в случае отсроченного или замедленного высвобождения активного sFc-рецептора в системе пациента, и при определенных обстоятельствах такие микрокристаллические формы даже могут считаться предпочтительными фармацевтическими композициями.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие микрокристаллические или кристаллические формы Fc-рецепторов, можно получать, например, путем концентрирования sFc до содержания, которое выходит за границы растворимости, с помощью традиционных методик концентрирования, таких как ультрафильтрация. Возможным является поддержание лекарственного препарата в жидкой форме, содержащей определенное количество кристаллов или микрокристаллов. Вместо применения механического способа концентрирования для получения кристаллов или микрокристаллов, также возможным и предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является кристаллизация рецептора с помощью доведения pH до значения, при котором рецептор характеризуется значительно более низкой растворимостью. Осажденные кристаллы или микрокристаллы можно отделять от раствора и применять для хранения и последующего восстановления или введения напрямую. Твердые лекарственные формы с рецепторами особенно устойчивы при хранении и сохраняют свою эффективность в течение по меньшей мере более 24 месяцев.

В таких случаях фармацевтическая композиция для удобства предусмотрена в виде фармацевтического набора, который, кроме твердого или высококонцентрированного sFcR, также содержит подходящую жидкость для восстановления раствора для инъекции.

Количество забуференного раствора, содержащегося в фармацевтическом наборе, подбирают относительно количества твердого или концентрированного sFcR в наборе. В зависимости от того, требуется ли полное растворение sFc-рецептора или поддержание некоторого количества микрокристаллов, выбирают подходящее количество жидкости соответствующего буфера, а также регулируют pH раствора согласно сведениям о растворимости sFcR, представленным в данном документе.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение лекарственных форм для подкожного введения и фармацевтических композиций по настоящему изобретению для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний. Более конкретно, настоящее изобретение предназначено для применения в рамках профилактики или лечения рассеянного склероза, системной красной волчанки, ревма-

тоидного артрита, первичной иммунной тромбоцитопении и аутоиммунной гемолитической анемии (АНА). Кроме того, лекарственные формы для подкожного введения и фармацевтические средства можно применять для лечения воспалительных заболеваний. Объект настоящего изобретения обеспечивает возможность применения Fc-рецепторов в отношении всех показаний, для которых это уже было описано, или для которых, как считается, они будут подходить в будущем. Лекарственные формы по настоящему изобретению и фармацевтические композиции предусматривают, в частности, подкожное введение, которое является очень эффективным и простым в применении в отношении пациента (или им самим). Возможность введения особенно высоких количеств и концентраций Fc-рецепторов является особым преимуществом настоящего изобретения.

В следующих примерах будет подробнее объясняться настоящее изобретение и его полезные эффекты и варианты осуществления.

Пример. Разработка высококонцентрированных жидких составов с $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$, подходящих для подкожной доставки.

1) Материалы.

Следующие растворы $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ (растворимый человеческий Fc γ RIIB-рецептор с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO. 1) применяли в качестве исходного материала для всех экспериментов:

а) 5 мг/мл концентрат $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ для приготовления раствора для инфузий:

5 мг/мл $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ в 5,3 мМ NaH_2PO_4 , 1,94 мМ KH_2PO_4 , 150 мМ NaCl , 2% (вес./об.) маннита, 0,005% полисорбата 20, pH 6,5;

б) 20 мг/мл концентрат $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ для приготовления раствора для инфузий:

20 мг/мл $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ в 20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl , 2% (вес./об.) сахарозы, 1% (вес./об.) маннита, 0,005% полисорбата 20, pH 6,5.

Применяли следующие химические вещества, характеризующиеся, по меньшей мере, указанной степенью чистоты:

Название	Чистота	Поставщик
Моногидрат лимонной кислоты	ч.д.а.	Merck
Гидроксид натрия	Ph. Eur. ($\geq 98\%$)	Carl Roth
Хлорид натрия	Ph. Eur. ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Этанол, абс.	Ph. Eur. ($\geq 99,8\%$)	Carl Roth
Гистидин	Ph. Eur. ($\geq 98,5\%$)	Carl Roth
Соляная кислота, 37%	ч.д.а.	Carl Roth
Сахароза	Ph. Eur. ($\geq 99\%$)	Carl Roth
Маннит	ACS реагент ($\geq 99\%$)	Fluka
Полисорбат 20 (Tween 20)	проверен на культуре клеток	Sigma Aldrich
Трегалоза	для биохимии	Merck

2) Методы.

а) Определение содержания $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ с помощью спектроскопии в УФ/видимой областях спектра.

Образец переносили в УФ-микрокювету (UV cuvette micro, Plastibrand, Brand) и измеряли поглощение при помощи спектрофотометра (Cary 100, Varian) с применением соответствующего буфера в качестве холостой пробы.

Концентрацию $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ рассчитывали с помощью следующего уравнения:

$$\text{конц. } \text{husFc}\gamma\text{RIIB} [\text{мг/мл}] = (A_{280} - A_{320}) \times DF \times 0,64,$$

DF - коэффициент разбавления.

б) Замена буфера у $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ с помощью катионообменной хроматографии.

1000-1800 мг $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ (5 мг/мл концентрат $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ для приготовления раствора для инфузий) аккуратно разбавляли с помощью 10 мМ цитрата/NaOH, pH 6,5, до тех пор пока электропроводность не достигала $5,0 \pm 0,1$ мСм/см. Разведенный белок фильтровали (0,2 мкм мембрана Dugapore из гидрофильного PVDF, 47 мм, Millipore) и наносили при скорости 5,5 мл/мин на 57 мл катионообменной (СЕХ) смолы SP Sepharose HP (26 × 107 мм, GE Healthcare; соответствует 17,5-31,6 мг $\text{husFc}\gamma\text{RIIB}$ /мл смолы), уравновешенной в 10 мМ цитрата/NaOH, 20 мМ NaCl , pH 6,5. Связанный белок промывали при скорости 5,5 мл/мин с помощью 200 мл 10 мМ цитрата/NaOH, 20 мМ NaCl , pH 6,5 и элюировали с помощью 300 мл линейного градиента от 20 до 600 мМ NaCl в 10 мМ цитрате/NaOH, pH 6,5. Сбор элюата начинали после того, как OD_{280} превышала 250 mAU (AU: единицы поглощения), и завершали, когда эта величина падала ниже 200 mAU (толщина слоя 1 см, Äkta Explorer 100, GE Healthcare). Колонку регенерировали с помо-

шью 100 мл 1М NaCl, промывали с помощью 150 мл MilliQ H₂O (вода высшей степени очистки, Millipore Corp.) и хранили до следующего применения в 20% этаноле. После измерения содержания husFcyRIIB с помощью спектроскопии в УФ/видимой части спектра элюат фильтровали (Millex 33 мм, 0,2 мкм Durapore из гидрофильного PVDF (поливинилиденфторид), оба от Millipore Corp.), разделяли на аликвоты, быстро замораживали в жидком азоте и хранили при $\leq -70^{\circ}\text{C}$ до применения.

Содержание NaCl рассчитывали по соотношению средней проводимости элюата к измеренной проводимости при 10 мМ цитрата/NaOH, 20 мМ NaCl и 10 мМ цитрата/NaOH, 600 мМ NaCl.

Забуференный гистидином husFcyRIIB получали аналогично, с применением в качестве буферного раствора 10 мМ гистидина/HCl.

с) Тест на стабильность pH.

Концентрированный раствор husFcyRIIB в 20 мМ гистидина, 324 мМ NaCl, pH 6,5, доводили до 0,5 мг/мл husFcyRIIB, 20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl, 2,5X Sypro Orange (5000X в DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) с применением подходящих основных растворов. pH раствора доводили до значений от pH 4 до pH 12 с помощью 0,2М HCl или 0,2М NaOH на основании экспериментальной титрационной кривой. 40 мкл раствора инкубировали в запечатанных 96-луночных планшетах с половинным объемом (µclear, черный, среднее связывание; Greiner BioOne) в течение 3 ч при 25°C и анализировали флуоресценцию Sypro Orange (возбуждение 485 нм, испускание 590 нм, усиление 60, временная задержка 0 мкс, время интеграции 40 мкс; TECAN Spectrofluor plus).

d) Получение высококонцентрированных растворов.

Требуемое содержание NaCl в забуференном гистидином или цитратом husFcyRIIB (начальная концентрация прилб. 200-300 мМ NaCl) доводили путем разведения соответствующим буфером (10 мМ нитрата или 10 мМ гистидина pH 6,5) и последующей ультрафильтрацией (Vivaspin 20, 5 кДа MWCO, Sartorius). Для сохранения небольших объемов обработки процедуру повторяли, в общей сложности, до 3 циклов. После осуществления конечного разведения измеряли pH (pH-метр HI8314, pH-электрод HI1217, Hanna instruments), доводили с помощью 0,2М NaOH или 0,2М HCl в соответствующем буфере и раствор белка концентрировали. Содержание husFcyRIIB измеряли с помощью спектроскопии в УФ/световой части спектра в трех повторностях, концентрацию husFcyRIIB доводили соответствующим буфером и раствор фильтровали (Ultrafree MC, 0,2 мкм Durapore с гидрофильным PVDF, Millipore).

e) Тесты на растворимость husFcyRIIB в 384-луночном формате.

Растворимость высококонцентрированных растворов husFcyRIIB в зависимости от буферного раствора, pH, концентрации соли и концентрации сахара/полиола оценивали в 384-луночном формате (µclear, белый, не связывающий, Greiner BioOne) с применением 30 мкл на лунку. Конечные составы готовили прямым добавлением профильтрованных основных растворов в каждую лунку. Применяли следующие основные растворы: 100-195 мг/мл husFcyRIIB, 1,5М NaCl и 30% (вес./об.) сахарозы + 15% (вес./об.) маннита в 10 мМ цитрата, pH 7,0, или 10 мМ гистидина, pH 5,5. В каждый раствор добавляли 0,01% (вес./вес.) полисорбата 20 и в зависимости от теста 10-50 мМ NaCl.

pH каждой лунки доводили с помощью 0,5-0,75М HCl или NaOH. Требуемое количество кислоты или щелочи рассчитывали на основании теоретических титрационных кривых при допущении, что все девять гистидиновых остатков husFcyRIIB ($pK_a = 6,00$) обеспечивают дополнительную буферную емкость. Планшет центрифугировали (500-g, 1 мин), запечатывали самоклеящейся лентой (microtest tape, petmacel, neo-lab) и хранили при $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ в темноте.

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии (Axiovert 25f, Carl Zeiss) и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

С учетом растворенной соли, сахара и белка осмоляльность каждого состава рассчитывали согласно следующему уравнению:

$$\xi_m = \sum_i v_i m_i F_{m,i}$$

где v_i представляет собой количество частиц, образованных в результате диссоциации одной молекулы i -го аналита, а m_i представляет собой моляльность i -го аналита. С целью упрощения моляльный осмотический коэффициент $F_{m,i}$ для каждого аналита считали равным 1.

f) Кристаллизация husFcyRIIB в малом масштабе.

10-450 мкл husFcyRIIB с концентрацией 50-140 мг/мл в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, 0,01% полисорбата 20, pH 5,5, разбавляли соответствующими разбавителями до 40 мг/мл husFcyRIIB в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, 0,01% полисорбата 20 в 1,5 мл полипропиленовой реакционной пробирке. pH доводили до 6,5-7,2 добавлением 4,38-6,23 об.% (конечного объема после добавления разбавителей) 0,3М NaOH. Требуемое количество кислоты или щелочи рассчитывали на основании теоретических титрационных кривых при допущении, что все девять гистидиновых остатков husFcyRIIB ($pK_a = 6,00$) обеспечи-

вают дополнительную буферную емкость.

г) Дифференциальная сканирующая флуориметрия.

120 мкл каждого состава, содержащего 0,5 мг/мл *husFcyRIIB*, готовили в 1,5 мл пробирке аналогично процедуре, описанной выше в 2.е). Sypro Orange (5000X в DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) добавляли до конечной концентрации 2,5X с применением 200X основного раствора в соответствующем буфере. 30 мкл каждого состава переносили в трех повторностях в планшет (MicroAmp 96-луночный оптический реакционный планшет, Applied Biosystems) и планшет запечатывали самоклеящейся лентой (оптическая самоклеящаяся лента MicroAmp, Applied Biosystems). Осуществляли быстрый нагрев планшета от 19 до 90°C с градиентом 1°C/мин и регистрировали испускание флуоресценции при 610 нм (система для ПЦР в режиме реального времени 7300, Applied Biosystems). Флуоресценцию дифференцировали относительно времени, рассчитывали сплайн-функцию и первый обнаруженный максимум считали температурой плавления *husFcyRIIB* (Origin 8.0, OriginLab).

h) Тест на мутность в 384-луночном формате.

Составы *husFcyRIIB* готовили в 1,5 мл пробирке аналогично процедуре, описанной выше в 2.3). 30 мкл каждого состава переносили в двух повторностях в 384-луночный планшет (µclear, белый, не связывающий, Greiner) и планшет запечатывали самоклеящейся лентой (microtest tape, permacel, neo-lab) и помещали в инкубатор. В качестве контроля готовили соответствующие растворы-плацебо. Мутность измеряли при 360 нм (Spectrafluor, полосный фильтр 360/35 нм, 3 вспышки, Tecan). Чтобы избежать искажения измерений вследствие конденсации воды, планшетный ридер предварительно нагревали до температуры анализа.

i) Измерение динамической вязкости по падению давления.

Динамическую вязкость составов, содержащих *husFcyRIIB*, определяли с помощью измерения падения давления по мере протекания жидкости через проточный канал (m-Vroc, Rheosense). Для каждого измерения 100 мкл состава при помощи 200 мкл пипетки цилиндр 100 мкл герметичного шприца (Hamilton).

Шприц устанавливали в реометр и впрыскивали 80 мкл при скорости потока 50 мкл/мин и 20°C.

ж) Количественный анализ содержания полисорбата 20.

Содержание полисорбата определяли с помощью модифицированного протокола, который основан на колориметрическом анализе, впервые описанном Brown and Hayes, (1955) Analyst 80, 755-767. 500 мкл раствора, подлежащего анализу, экстрагировали трижды с помощью 500 мкл этилацетата в 1,5 мл полипропиленовой пробирке (VWR). Чтобы ускорить разделение фаз, пробирку центрифугировали (20000-g, 5 мин, 25°C). Органические супернатанты объединяли во флаконе для HPLC (ND9, с резьбой, коническим дном и завинчивающейся крышкой из PTFE, VWR) и испаряли растворитель (25°C, 10 мбар, 0,5-1 ч). Остаточные твердые вещества суспендировали в 800 мкл раствора реагентов (100 мМ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, 2,63М NH_4SCN в воде) и экстрагировали с помощью 150 мкл CHCl_3 . 100 мкл экстракта в CHCl_3 переносили в кварцевую УФ-микрокювету (Hellma), измеряли спектр от 200 до 800 нм (спектрофотометр с диодной матрицей 8453, Agilent) и регистрировали поглощение при 620 нм, скорректированное с помощью поглощения при 530 нм. В качестве холостой пробы применяли экстракт эквивалентного раствора, не содержащего полисорбат 20. Каждый образец готовили в двух повторностях. Содержание полисорбата 20 определяли на основании стандартной кривой от 0 до 0,006% (вес./вес.) полисорбата 20 в соответствующем буфере.

к) Лиофилизация.

Готовили 59 составов, содержащих 15-120 мг/мл *husFcyRII* в 5 мМ цитрата, 10-25 мМ NaCl, 2-8% (вес./об.) сахарозы, трегалозы или маннита и 0,005-0,01% (вес./об.) полисорбата 20, и 400 мкл вливали в 1,5 мл прозрачные флаконы для HPLC (32 × 11,6 мм, широкое отверстие, VWR). Флаконы подвергали консервативному циклу лиофилизации с помощью лиофилизатора Epsilon 2-12D FD02 (Martin Christ, Остероде, Германия). Вакуум во время процесса лиофилизации контролировали с помощью емкостного манометра MKS. Пробы замораживали при -45°C, первичную сушку проводили в течение 15 ч при температуре от 45 до 15°C, 0,12 мбар, а вторичную сушку проводили в течение 10 ч при температуре от 15 до 20°C, 0,12 мбар. Лиофилизаты восстанавливали в 100-400 мкл воды для инъекций. Раствор анализировали на образование твердых частиц при помощи визуального осмотра, измерения мутности и флуоресцентной микроскопии. Вкратце, для исследования на флуоресцентном микроскопе 50 мкл раствора, содержащего *husFcyRIIB*, помещали в 384-луночный планшет (µclear, белый, несвязывающий, Greiner) и смешивали с 5 мкл 25X Sypro Orange (5000X в DMSO, Molecular Probes™, Invitrogen) в 5 мМ цитрате, 10 мМ NaCl, pH 6,7. Планшет инкубировали в течение 10 мин при 25°C, центрифугировали (1000-g, 3 мин) и внешний вид каждого состава оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии (Axiovert 25f, фильтр возбуждения 470/20 нм, дихроичный фильтр 493 нм, фильтр испускания 503-530 нм, Carl Zeiss).

3) Результаты.

а) Определение диапазона pH и буферных растворов для высококонцентрированных растворов *husFcyRIIB*.

Диапазон значений pH, вызывающих денатурацию *husFcyRIIB*, определяли с применением Sypro

Orange в качестве индикатора присутствия развернутого белка. Sypro Orange представляет собой чувствительный к окружающим условиям краситель, испускание флуоресценции которого сильно увеличивается после его связывания с гидрофобными структурами (Layton & Hellinga, 2010, *Biochemistry* 49 (51), 10831-10841). На фиг. 1 показаны результаты экспериментов по определению диапазона значений pH, вызывающих денатурацию. Таким образом, 0,5 мг/мл husFcyRIIB в 20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl (о) и холостую пробу буфера (+) инкубировали при соответствующем pH в течение 3 ч при комнатной температуре. Увеличение флуоресценции Sypro Orange указывало на присутствие денатурированного husFcyRIIB. Как показано на фиг. 1, husFcyRIIB не разворачивался при значениях от pH 5,2 до, по меньшей мере, pH 11.

Для предотвращения болезненных ощущений во время подкожного введения вводимый раствор должен иметь pH в физиологическом диапазоне. Типичные буферные растворы, которые имеют буферные свойства в этом диапазоне и, в целом, считаются безопасными, включают гистидиновый (pKa ~6,0), питратный (pKa₃ ~6,4) и фосфатный (pKa₂ ~7,2). Вследствие его свойства стимуляции сдвигов pH во время замораживания/оттаивания (MacKenzie, 1977) фосфатный буфер не включали в последующие тесты на растворимость.

При первой попытке определить предельную концентрацию husFcyRIIB относительно осаждения белка, husFcyRIIB концентрировали путем ультрафильтрации в присутствии 10 мМ гистидина или 10 мМ цитрата и 10 мМ NaCl до начала образования видимого осадка. Как показано в табл. 1, в случае забуференного гистидином husFcyRIIB показана увеличенная растворимость в слабокислом диапазоне от pH 5,5 до 6,0, тогда как цитрат в качестве буферного раствора обеспечивал растворимость диапазоне pH, близких к нейтральным, приблизительно pH 6,5. Подытоживая вышесказанное, растворимость husFcyRIIB при различных pH значительно зависит от применяемого буферного раствора. При микроскопическом исследовании видно, что осадок состоит из кристаллических игл.

Таблица 1. Предел растворимости husFcyRIIB (мг/мл) в 10 мМ гистидина или 10 мМ цитрата при низкой ионной силе при pH 5,5-7,5

	pH			
	5,5	6,0	6,5	7,0
Гистидин	>162	≤174	≤40	≤10
Цитрат	≤40	≤158	>154	>148

husFcyRIIB концентрировали ультрафильтрацией до тех пор, пока раствор не становился мутным. Забуференный гистидином husFcyRIIB осаждался при pH 6,0, 6,5 и 7,0, при этом забуференный цитратом husFcyRIIB осаждался при pH 5,5 и pH 6,0. Осадок определили как кристаллы белка husFcyRIIB.

б) Кристаллизация husFcyRIIB.

Забуференный гистидином husFcyRIIB остается растворимым при концентрации более 100 мг/мл при pH 5,5, и его можно кристаллизовать с помощью нейтрализации при низкой ионной силе, напротив, забуференный цитратом husFcyRIIB при нейтральном pH остается растворимым при концентрации более 100 мг/мл, и его можно кристаллизовать с помощью легкого подкисления при низкой ионной силе (табл. 1). В дополнительном тесте изучали кристаллизацию husFcyRIIB в зависимости от присутствия и количества сахара и NaCl в буфере. Кристаллизацию husFcyRIIB проводили в 10 мМ гистидина, pH 6,7 (фиг. 2а), или 10 мМ цитрата, pH 5,5 (фиг. 2б), определяя зависимость от концентрации NaCl и сахара (2:1 сахароза:маннит). husFcyRIIB в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, pH 5,5, или 10 мМ цитрата, 10 мМ NaCl, pH 7,0 соответственно, концентрировали до 140 мг/мл ультрафильтрацией и разбавляли до 40 мг/мл при помощи соответствующих основных растворов. В случае забуференного гистидином husFcyRIIB выход кристаллов определяли, измеряя концентрацию husFcyRIIB в супернатанте после 3 дней при 2-8°C. В случае забуференного цитратом husFcyRIIB рост кристаллов не наблюдали вплоть до дня 10. Таким образом, выход кристаллов определяли после 14 дней при 2-8°C. Каждый раствор содержал 0,01% полисорбата 20.

На фиг. 2 показано, что husFcyRIIB легче кристаллизуется и выход кристаллов намного выше в присутствии 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, pH 6,7, по сравнению с 10 мМ цитрата, 10 мМ NaCl, pH 5,5. Дополнительное уменьшение концентрации хлорида натрия с 10 мМ до 5 мМ приводило к незначительному увеличению выхода кристаллов при использовании в качестве буферного раствора гистидина, но показало сильный эффект при использовании нитратного буфера. Уменьшение концентрации соли ниже 5 мМ и/или уменьшение pH могут дополнительно стимулировать процесс кристаллизации в присутствии цитрата. Увеличение концентрации NaCl или добавление полиолов, например сахарозы или маннита, до концентрации выше 5% ингибировало процесс кристаллизации.

На фиг. 3 показан эксперимент, в котором кристаллизацию husFcyRIIB проводили в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, определяя зависимость от pH. husFcyRIIB в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, pH 5,5, концентрировали до 140 мг/мл ультрафильтрацией и разбавляли до 40 мг/мл при помощи соответствующих основных растворов. Выход кристаллов определяли, измеряя концентрацию husFcyRIIB в суперна-

танте после 3 дней при 2-8°C. Каждый раствор содержал 0,01% полисорбата 20.

В пределах диапазона pH, составляющего по меньшей мере 0,5 единицы, может кристаллизовать более 93% забуференного гистидином husFcγRIIB. При общей концентрации husFcγRIIB, составляющей 40 мг/мл, предел растворимости husFcγRIIB в 10 мМ гистидина, 10 мМ NaCl, pH 6,7-7,2, составляет менее 2,8 мг/мл. При pH 6,9 кристаллизация завершается менее чем за один час при 25°C.

с) Тесты на растворимость husFcγRIIB.

Для определения так называемых активных точек растворимости, т.е. условий, при которых husFcγRIIB остается растворимым при концентрации выше 100 мг/мл и не кристаллизуется, в 384-луночном титрационном микропланшете готовили различные составы husFcγRIIB и их инкубировали по меньшей мере в течение 4 недель при 2-8°C. Параметры, включенные в тест, представляли собой концентрацию husFcγRIIB (70, 100, 120 и 150 мг/мл), буферные растворы (гистидин или цитрат), pH (5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5), концентрацию NaCl (10-225 мМ) и содержание сахара (0-7,5%). Начальные тесты при 70 мг/мл (табл. 2 и 5) и 100 мг/мл husFcγRIIB (табл. 3 и 6) проводили с двумя уровнями сахара (0 или 3%) и четырьмя различными концентрациями NaCl (10, 50, 225 мМ).

В принципе, эти предварительные тесты воспроизвели результаты, которые уже были получены в ходе вышеупомянутых тестов на растворимость (пример 2a) и тестов на кристаллизацию (пример 2b). Забуференный гистидином husFcγRIIB кристаллизовался при pH выше 5,5, при этом забуференный цитратом husFcγRIIB кристаллизовался при pH 5,5-6,0. Увеличение концентрации NaCl или сахара уменьшало процесс кристаллизации в обоих случаях.

Во всех последующих тестах при 120 и 150 мг/мл husFcγRIIB включали только составы, которые были изотоничны с кровью, т.е. с рассчитанной осмоляльностью приблизительно 308 мОсмоль/кг. По этой причине высокие концентрации сахара сочетали с низкими концентрациями NaCl и наоборот. Составы на основе гистидина с 120 мг/мл husFcγRIIB могли предотвращать кристаллизацию husFcγRIIB при нейтральном pH и высокой ионной силе, но, за одним исключением, для всех составов на основе гистидина с 150 мг/мл husFcγRIIB показан сильный рост кристаллов после 4 недель при 2-8°C (табл. 4). С другой стороны, составы на основе цитрата были устойчивы вплоть до 150 мг/мл husFcγRIIB при pH 6,5-7,5 и в случае всех протестированных комбинаций сахар/соль (табл. 7).

Таким образом, забуференный цитратом husFcγRIIB представляет собой наилучшую основу для разработки высококонцентрированного жидкого состава, подходящего для подкожного применения, т.е. с физиологическим pH и тоничностью.

Таблица 2. Тест на растворимость состава на основе гистидина с 70 мг/мл husFcγRIIB при 2-8°C

husFcγRIIB [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	1 д.	8 д.	14 д.	29 д.	Суммарное значение
70	5,5	0	10	24	0	0	0	0	0	0
70	6,0	0	10	24	1	3	4	4	4	16
70	6,5	0	10	24	2	5	5	5	5	22
70	7,0	0	10	24	1	5	5	5	5	21
70	7,5	0	10	24	0	0	5	5	5	15
70	5,5	3	10	137	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	10	137	0	0	2	3	3	8
70	6,5	3	10	137	0	5	5	5	5	20
70	7,0	3	10	137	0	0	0	0	5	5
70	7,5	3	10	137	0	0	5	5	5	15
70	5,5	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	6,0	0	50	104	0	2	3	3	3	11
70	6,5	0	50	104	0	0	0	0	5	5
70	7,0	0	50	104	0	0	0	0	1	1
70	7,5	0	50	104	0	0	4	4	4	12
70	5,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	50	217	0	0	0	0	2	2
70	6,5	3	50	217	0	0	0	0	5	5
70	7,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	50	217	0	0	1	3	5	9
70	5,5	0	225	454	0	0	0	0	1	1
70	6,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	6,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

Таблица 3. Тест на растворимость состава на основе гистидина с 100 мг/мл husFcγRIIB при 2-8°C

husFcγRIIB [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	1 д.	8 д.	14 д.	28 д.	Суммарное значение
100	5,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	6,0	0	10	25	5	5	5	5	5	25
100	6,5	0	10	25	0	5	5	5	5	20
100	7,0	0	10	25	0	1	4	4	5	14
100	7,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	10	138	1	4	4	4	4	17
100	6,5	3	10	138	0	5	5	5	5	20
100	7,0	3	10	138	3	5	5	5	5	23
100	7,5	3	10	138	2	2	2	2	4	12
100	5,5	0	50	105	0	0	0	0	1	1
100	6,0	0	50	105	0	3	3	4	4	14
100	6,5	0	50	105	5	5	5	5	5	25
100	7,0	0	50	105	4	5	5	5	5	24
100	7,5	0	50	105	2	3	1	0	1	7
100	5,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	50	218	1	4	4	4	4	17
100	6,5	3	50	218	4	5	5	5	5	24
100	7,0	3	50	218	0	0	0	0	4	4
100	7,5	3	50	218	0	0	0	0	1	1
100	5,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	6,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	6,5	0	225	455	0	0	0	0	1	1
100	7,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,5	3	225	568	2	2	3	3	3	13
100	7,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

Таблица 4. Тест на растворимость состава на основе гистидина с
120 мг/мл/150 мг/мл husFcyRIIB при 2-8°C

husFcyRIIB [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	7 д.	14 д.	28 д.	Суммарное значение
120	5,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	6,0	6	50	332	0	0	0	3	3
120	6,5	6	50	332	0	0	0	4	4
120	7,0	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,5	6	50	332	0	0	1	1	2
120	5,5	4,5	75	326	0	1	1	2	4
120	6,0	4,5	75	326	0	0	1	1	2
120	6,5	4,5	75	326	0	0	4	4	8
120	7,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,5	4,5	75	326	0	2	3	3	8
120	5,5	3	100	319	2	2	3	3	10
120	6,0	3	100	319	0	0	2	3	5
120	6,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,0	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	5,5	1,5	125	313	0	5	5	5	15
120	6,0	1,5	125	313	0	0	1	2	3
120	6,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,0	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
150	5,5	6	50	334	2	2	2	2	8
150	6,0	6	50	334	0	2	3	3	8
150	6,5	6	50	334	0	5	5	5	15
150	7,0	6	50	334	0	0	0	5	5
150	7,5	6	50	334	0	0	0	5	5
150	5,5	4,5	75	327	0	1	3	5	9
150	6,0	4,5	75	327	1	3	4	4	12
150	6,5	4,5	75	327	5	5	5	5	20
150	7,0	4,5	75	327	5	5	5	5	20
150	7,5	4,5	75	327	4	5	5	5	19
150	5,5	3	100	321	0	5	5	5	15
150	6,0	3	100	321	5	5	5	5	20
150	6,5	3	100	321	4	5	5	5	19
150	7,0	3	100	321	3	5	5	5	18
150	7,5	3	100	321	0	0	0	0	0
150	5,5	1,5	125	314	2	5	5	5	17
150	6,0	1,5	125	314	3	5	5	5	18
150	6,5	1,5	125	314	3	5	5	5	18
150	7,0	1,5	125	314	3	5	5	5	18
150	7,5	1,5	125	314	3	5	5	5	18

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

Таблица 5. Тест на растворимость состава на основе цитрата с 70 мг/мл $\text{husFc}\gamma\text{R11B}$ при 2-8°C

$\text{husFc}\gamma\text{R11B}$ [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	1 д.	8 д.	17 д.	30 д.	Суммарное значение
70	5,5	0	10	24	0	3	5	5	5	18
70	6,0	0	10	24	0	1	2	3	3	9
70	6,5	0	10	24	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	10	24	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	10	24	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	10	137	0	0	3	4	5	12
70	6,0	3	10	137	0	0	0	1	1	2
70	6,5	3	10	137	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	10	137	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	10	137	0	0	0	0	0	0
70	5,5	0	50	104	0	2	4	5	5	16
70	6,0	0	50	104	0	1	1	1	2	5
70	6,5	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	50	104	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	50	217	0	1	2	3	4	10
70	6,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	50	217	0	0	0	0	0	0
70	5,5	0	225	454	0	2	3	4	4	13
70	6,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	6,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,0	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	7,5	0	225	454	0	0	0	0	0	0
70	5,5	3	225	567	0	0	0	1	1	2
70	6,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	6,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,0	3	225	567	0	0	0	0	0	0
70	7,5	3	225	567	0	0	0	0	0	0

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

Таблица 6. Тест на растворимость состава на основе цитрата с 100 мг/мл husFcγRIIB при 2-8°C

husFcγRIIB [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	4 д.	7 д.	15 д.	28 д.	Суммарное значение
100	5,5	0	10	25	1	5	5	5	5	21
100	6,0	0	10	25	1	4	5	5	5	20
100	6,5	0	10	25	0	1	1	1	2	5
100	7,0	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	10	25	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	10	138	0	3	4	4	5	16
100	6,0	3	10	138	0	1	3	4	5	13
100	6,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	10	138	0	0	0	0	0	0
100	5,5	0	50	105	0	5	5	5	5	20
100	6,0	0	50	105	0	3	4	5	5	17
100	6,5	0	50	105	0	0	1	1	1	3
100	7,0	0	50	105	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	50	105	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	50	218	0	0	3	4	5	12
100	6,0	3	50	218	0	0	0	0	3	3
100	6,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	50	218	0	0	0	0	0	0
100	5,5	0	225	455	0	3	4	4	4	15
100	6,0	0	225	455	0	1	1	2	3	7
100	6,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,0	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	7,5	0	225	455	0	0	0	0	0	0
100	5,5	3	225	568	0	0	1	3	4	8
100	6,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	6,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,0	3	225	568	0	0	0	0	0	0
100	7,5	3	225	568	0	0	0	0	0	0

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

Таблица 7. Тест на растворимость состава на основе цитрата с 120 мг/мл/150 мг/мл husFcγRIIB при 2-8°C

husFcγRIIB [мг/мл]	pH	Сахар [%]	NaCl [мМ]	Осмоляльность [мОсмоль/кг]	0 д.	7 д.	14 д.	28 д.	Суммарное значение
120	6,0	7,5	25	339	0	1	2	3	6
120	6,5	7,5	25	339	0	0	0	0	0
120	7,0	7,5	25	339	0	0	0	0	0
120	7,5	7,5	25	339	0	0	0	0	0
120	6,0	6	50	332	0	2	3	4	9
120	6,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,0	6	50	332	0	0	0	0	0
120	7,5	6	50	332	0	0	0	0	0
120	6,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	6,5	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,0	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	7,5	4,5	75	326	0	0	0	0	0
120	6,0	3	100	319	0	2	3	3	8
120	6,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,0	3	100	319	0	0	0	0	0
120	7,5	3	100	319	0	0	0	0	0
120	6,0	1,5	125	313	0	1	2	2	5
120	6,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,0	1,5	125	313	0	0	0	0	0
120	7,5	1,5	125	313	0	0	0	0	0
150	6,0	7,5	25	340	0	2	3	4	9
150	6,5	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	7,0	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	7,5	7,5	25	340	0	0	0	0	0
150	6,0	6	50	334	0	1	2	4	7
150	6,5	6	50	334	0	0	0	0	0
150	7,0	6	50	334	0	0	0	0	0
150	7,5	6	50	334	0	0	0	0	0
150	6,0	4,5	75	327	0	0	2	3	5
150	6,5	4,5	75	327	0	0	0	0	0
150	7,0	4,5	75	327	0	0	0	0	0
150	7,5	4,5	75	327	0	0	0	0	0
150	6,0	3	100	321	0	0	0	0	0
150	6,5	3	100	321	0	0	0	1	1
150	7,0	3	100	321	0	0	0	0	0
150	7,5	3	100	321	0	0	0	0	0
150	6,0	1,5	125	314	0	1	2	2	5
150	6,5	1,5	125	314	0	0	0	0	0
150	7,0	1,5	125	314	0	0	0	0	0
150	7,5	1,5	125	314	0	0	0	0	0

Внешний вид каждого состава оценивали с помощью световой микроскопии и ранжировали в соответствии с условной шкалой (0 - кристаллы отсутствуют; 1 - кристаллов немного, они едва видны; 2 - кристаллов немного, они четко видны; 3 - более 30 кристаллов на лунку, они четко видны; 4 - неполный слой из большого количества кристаллов (лунка не полностью покрыта); 5 - полный слой из большого количества кристаллов (лунка полностью покрыта).

d) Термоустойчивость высококонцентрированных составов husFcγRIIB.

Образование ненативных агрегатов белков и твердых частиц может служить большим препятствием для разработки высококонцентрированного белкового состава (Shire et al., 2010, Chapter 15. High-concentration antibody formulations. B: Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals. Jameel F. & Hershenson S., eds., John Wiley, Hoboken, NJ). По этой причине составы-кандидаты (см. пример 2с) ранжировали в отношении их способности сохранять нативную структуру husFcγRIIB при тепловом стрессе и, следовательно, способности препятствовать ненативной агрегации.

Вначале с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии измеряли температуру плавления T_m забуференного цитратом состава husFcγRIIB. На фиг. 4 показаны соответствующие результаты, которые получили с применением 0,5 мг/мл husFcγRIIB в 10 мМ цитрата, 4,5% сахара (2:1 (вес./вес.) сахароза:маннит), 75 мМ NaCl при указанных pH (фиг. 4 (а) и (с)), или 0,5 мг/мл husFcγRIIB в 10 мМ цитрата, pH 7,0, дополненного указанным количеством сахара (2:1 (вес./вес.) сахароза:маннит) и соли (фиг. 4 (b) и (d)). Составы husFcγRIIB нагревали в 96-луночном титрационном микропланшете при 1°C/мин в присутствии Syngro Orange и регистрировали испускание флуоресценции при 610 нм. Показаны графики зависимости флуоресценции от температуры (а) и (b) и их первые производные (с) и (d). Первый максимум на графиках dF/dT считали температурой плавления husFcγRIIB.

В зависимости от композиции соответствующего состава-кандидата измеряли значения T_m от 50,8

до 55,5°C. Наибольшее влияние на температуру плавления оказывало значение pH, при этом T_m увеличивалась примерно на 3,5°C при снижении pH с 7,5 до 6,5. Добавление 7,5% сахара повышало T_m на приблизительно 1°C (На фиг. 5 показано изменение температуры плавления husFcyRIIB в зависимости от pH, концентрации сахара и соли в 10 мМ цитрате. Показано среднее значение и стандартное отклонение на основании трех независимых лунок). Хотя концентрацию NaCl снижали параллельно, увеличение термоустойчивости явно зависит от увеличения концентрации сахара, а не понижения концентрации соли, как показано в ранее проведенных экспериментах (данные не показаны), что соответствует теории предпочтительного исключения (Timasheff, 1992, Chapter 9. Stabilization of Protein Structure. In Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B: In vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization. Ahern T.J. & Manning M.C., eds., Plenum Press, New York, pp. 265-285). Примером этого также является повышение концентрации сахара от 7,5 до 40%, которое приводит к повышению T_m на 6,2°C.

Затем определяли, в какой степени стабилизация вторичной и третичной структуры husFcyRIIB, на что указывает высокая температура плавления, будет ингибировать образование нерастворимых агрегатов белка. Таким образом, мутность забуференных цитратом составов husFcyRIIB измеряли после инкубации при 37°C, температуре значительно более низкой, чем измеренная T_m . С этой целью определяли ускоренную стабильность забуференных цитратом составов husFcyRIIB при 37°C. Измеряли оптическую плотность при 360 нм в зависимости от концентрации husFcyRIIB и сахарозы через 1 ч (а), 12 ч (b) и 7 дней (с). Все составы содержали 10 мМ цитрата, pH 7,0, 25 мМ NaCl. Вычитали оптическую плотность контрольного буфера. При 40% сахарозы самый высококонцентрированный состав содержал только 60 мг/мл husFcyRIIB, а не 80 мг/мл.

Эти результаты приведены на фиг. 6. При увеличении концентрации сахарозы (увеличение концентраций на всех диаграммах фигуры 6 показано сзади наперед по оси z), т.е. при повышении температуры плавления белка, возрастание мутности замедлялось. Все составы без добавления сахарозы с концентрацией husFcyRIIB ≥ 10 мг/мл становились мутными уже через один час при 37°C, тогда как в присутствии 40% сахарозы не наблюдалось значительного увеличения мутности вплоть до 60 мг/мл husFcyRIIB даже через семь дней при 37°C. Выше определенной концентрации белка абсолютная мутность увеличивается линейно с увеличением концентрации husFcyRIIB, но ниже этого порога образование нерастворимых агрегатов белка происходит крайне медленно или даже ингибируется. С увеличением концентрации сахарозы этот порог смещается к более высоким концентрациям husFcyRIIB, но для стабилизации husFcyRIIB при 37°C и концентрации, превышающей 60 мг/мл, будут необходимы недопустимо высокие с физиологической точки зрения концентрации сахарозы.

Еще один тест проводили для определения ускоренной стабильности забуференных цитратом составов husFcyRIIB при 40°C. Результаты показаны на фиг. 7. Повышение оптической плотности при 360 нм измеряли у 10 мг/мл husFcyRIIB в 10 мМ цитрата, 150 мМ NaCl, pH 7,0, дополненного 10%/292 мМ сахарозы (а, Δ), 10%/292 мМ трегалозы (а, \square), 5%/274 мМ маннита (а, о), 30%/876 мМ сахарозы (b, Δ), 30%/876 мМ трегалозы (b, \square), 15%/822 мМ маннита (b, о). Также показан контрольный буфер, дополненный 20% сахарозы (\bullet).

На основании этих наблюдений разные сахара и сахароспирты ранжировали согласно их способности подавлять образование нерастворимых агрегатов белка. Как показано на фиг. 7, наиболее эффективным стабилизатором является сахароза.

е) Определение требуемой концентрации детергента.

Анализ мутности (данные не показаны) указывает, как согласуется с опубликованными данными (Timasheff, 1992, Chapter 9. Stabilization of Protein Structure. In Stability of Protein Pharmaceuticals, Part B: In vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization. Ahern T.J. & Manning M.C., eds., Plenum Press, New York, pp. 265-285), что увеличение концентрации детергента дестабилизирует husFcyRIIB. Также высказано предположение, что применение высоких концентраций детергента может приводить к повышенной иммуногенности (Hermeling et al., 2003, Pharm. Res. 20, 1903-1907). По этой причине следовало бы обязательно поддерживать концентрацию детергента как можно более низкой, но без ущерба для его стабилизирующего влияния на поверхностное натяжение.

В идеале, концентрацию полисорбата 20 следовало бы зафиксировать на 0,005%, концентрации, которая применяется в уже признанных жидких составах husFcyRIIB, содержащих 5-20 мг/мл husFcyRIIB. Но, так как концентрация нового разработанного состава будет превышать 50 мг/мл, а полисорбат 20 может связываться с белком, был поставлен вопрос, не следует ли повысить концентрацию детергента выше 0,005%.

Для проверки гипотезы неспецифического связывания детергента белком забуференный цитратом состав-кандидат, содержащий 0,005% полисорбата 20, дополняли увеличивающимися концентрациями husFcyRIIB, и растворы инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре и при 60°C, температуре, значительно превышающей T_m husFcyRIIB. После удаления белка и гипотетически связанного полисорбата 20 с помощью катионообменной хроматографии измеряли количество свободного полисорбата. На фиг. 8 показан эксперимент, в котором определяли количество свободного полисорбата 20

в присутствии husFcyRIIB . husFcyRIIB в 10 мМ цитрата, 25 мМ NaCl, 3% сахарозы, 1,5% маннита, 0,005% полисорбата 20, pH 6,7, инкубировали в течение 1 ч при 25°C (нативный husFcyRIIB) и 60°C (денатурированный husFcyRIIB). После удаления husFcyRIIB с помощью катионообменной хроматографии (СЕХ) измеряли количество полисорбата 20 (а). Холостая проба представляла собой буфер без добавления husFcyRIIB или детергента. Проверки пригодности системы (SST) представляют собой буфер с 0,005% полисорбата 20, SST2 после обработки с помощью СЕХ, а SST1 без нее. Измеренное содержание полисорбата при 0,08-0,72 мг/мл husFcyRIIB экстраполировали на концентрации husFcyRIIB более 10 мг/мл с помощью линейной регрессии ($R^2 > 0,998$) концентрации полисорбата в зависимости от логарифма концентрации husFcyRIIB (b).

Как показано на фиг. 8, установили существование линейной зависимости между содержанием свободного полисорбата и логарифмом концентрации husFcyRIIB . Таким образом, ожидается, что концентрация свободного полисорбата будет меняться в незначительной степени, приблизительно на 0,0001-0,0002%, в случае, если концентрация состава увеличится с 20 до 100 мг/мл. Значительно более низкая концентрация полисорбата в пробах по сравнению с 0,005% в контроле, в значительной степени связана с тем фактом, что при загрузке в колонку образцы разбавляли уравнивающим буфером для СЕХ, который готовили без полисорбата 20 (см. фиг. 8 SST 1 в сравнении с SST2).

f) Вязкость высококонцентрированных составов husFcyRIIB .

Высококонцентрированные составы белков характеризуются высокой вязкостью (Shire et al., 2010, выше). Следовательно, возможность производства высококонцентрированных составов белков может быть затруднена из-за их вязкости, поскольку способ концентрации с помощью фильтрации тангенциальным потоком может проходить неприемлемо медленно. В следующем эксперименте вязкость раствора husFcyRIIB в 10 мМ цитрата, 25 мМ NaCl, pH 7,0, измеряли при 20°C. Экспериментальные данные, как показано на фиг. 9 (о), согласовывались с функцией экспоненциального роста (-, $R^2 > 0,992$), и обнаружили, что вязкость раствора состава является достаточно низкой для запуска экономичных способов TFF до концентрации по меньшей мере 210 мг/мл.

g) Лиофилизация составов, содержащих husFcyRIIB .

59 составов с разным содержанием husFcyRIIB , сахара, соли и детергента подвергали консервативному циклу лиофилизации. Твердые вещества восстанавливали объемом воды для инъекции, который был равен или меньше исходного объема до процесса лиофилизации. Поступая таким образом, содержание husFcyRIIB после восстановления доводили до номинального содержания 60-180 мг/мл. Пригодность различных составов для лиофилизации оценивали на основании времени восстановления и загрязнения твердыми частицами после восстановления. Установили несколько составов, которые могли восстанавливаться менее чем за 2 мин и не демонстрировали ни увеличенную мутность, ни образование твердых частиц как видимых, так и не видимых невооруженным глазом. На основании вышеописанной лиофилизационного теста было показано, что идеальные составы содержали малые количества husFcyRIIB (например, 15-60 мг/мл) до лиофилизации и восстанавливались в малых объемах воды для инъекций, тем самым с увеличением конечной концентрации детергента. Содержание твердых частиц в выбранных составах, определяемое с помощью флуоресцентной микроскопии, показано на фиг. 10. Все составы содержали 5 мМ цитрата, pH 6,7 и указанное количество соли, сахара и детергента. Составы лиофилизировали и восстанавливали до указанного содержания husFcyRIIB .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лекарственная форма для подкожного введения для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, инфекций, опухолей и других состояний, в которые вовлечена иммунная система, содержащая растворимый Fcγ-рецептор (sFcγR) в водном забуференном растворе, где концентрация Fcγ-рецептора превышает 60 мг/мл вплоть до 220 мг/мл и где она содержит физиологически приемлемое буферное вещество в эффективном количестве, причем буферное вещество выбрано из гистидина и цитрата, pH лекарственной формы имеет значение от 5,2 до 7,5 и Fc-рецептор представляет собой FcγRIIB.

2. Лекарственная форма по п.1, где концентрация Fcγ-рецептора превышает 80 мг/мл, предпочтительно превышает 100 мг/мл, более предпочтительно превышает 150 мг/мл и наиболее предпочтительно превышает 200 мг/мл.

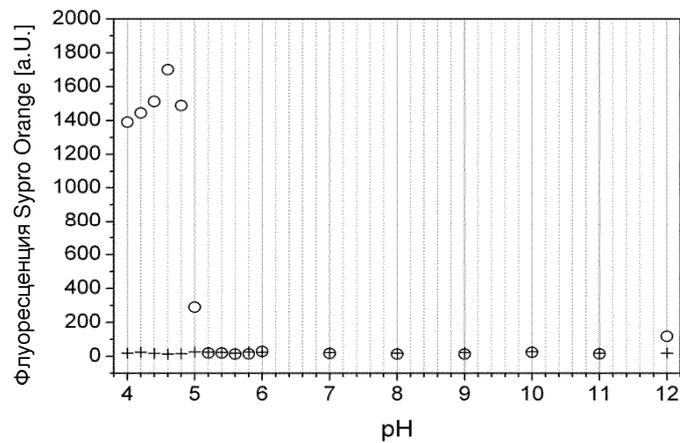
3. Лекарственная форма по любому из предыдущих пунктов, содержащая дополнительные вещества, выбранные из сахаров, солей и детергентов.

4. Лекарственная форма по любому из предыдущих пунктов, где рецептор присутствует в растворенной форме.

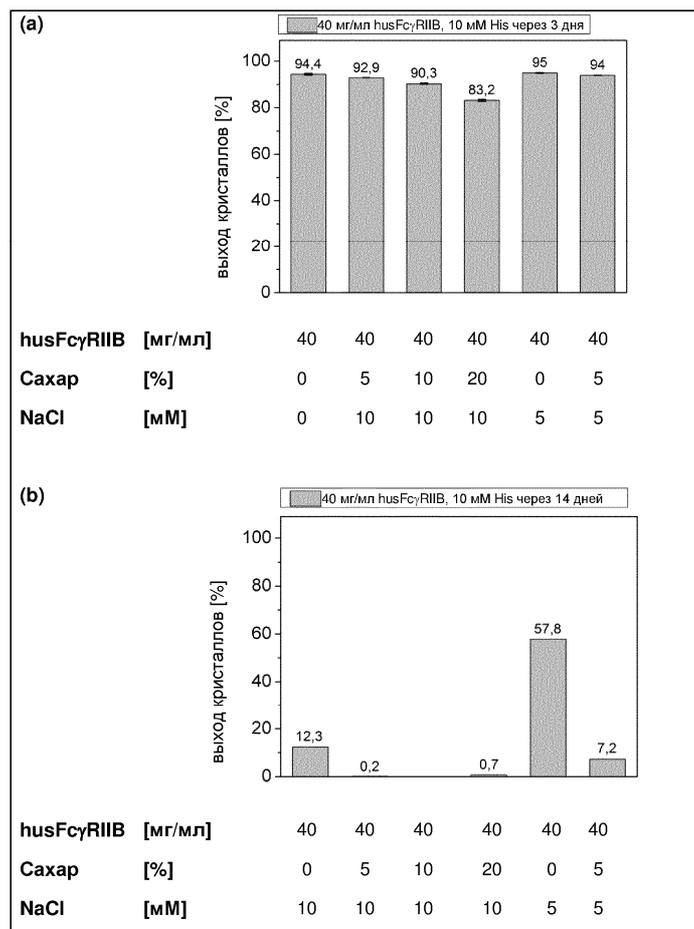
5. Лекарственная форма по п.3 или 4, представляющая собой забуференный цитратом раствор, и pH имеет значение от 6,0 до 7,5.

6. Лекарственная форма по п.3 или 4, представляющая собой забуференный гистидином раствор, и pH имеет значение от 5,2 до 5,9.

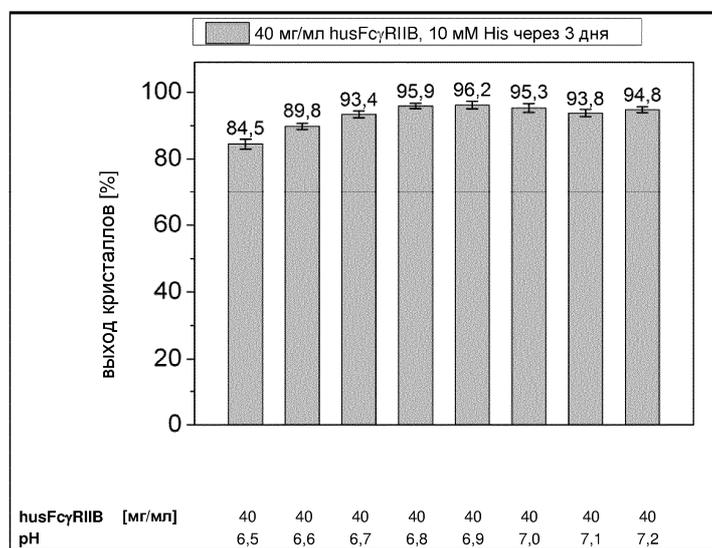
7. Лекарственная форма по любому из пп.1-3, содержащая рецептор в кристаллической форме.
8. Лекарственная форма по п.7, представляющая собой забуференный цитратом раствор, и рН имеет значение от 5,2 до 5,9.
9. Лекарственная форма по п.7, представляющая собой забуференный гистидином раствор, и рН имеет значение от 6,0 до 7,5.
10. Фармацевтическая композиция, содержащая лекарственную форму по любому из пп.1-9.
11. Фармацевтическая композиция по п.10, где указанная лекарственная форма присутствует в комбинации с фармацевтически приемлемыми наполнителями, и/или вспомогательными веществами, и/или носителями.
12. Фармацевтическая композиция по п.10 или 11, предназначенная для подкожной инъекции эффективного количества $\text{Fc}\gamma$ -рецептора для профилактики или лечения аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, инфекций, опухолей и других состояний, в которые вовлечена иммунная система.
13. Применение лекарственной формы по любому из пп.1-9 для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичная иммунная тромбоцитопения или аутоиммунная гемолитическая анемия.
14. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.10-12 для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичная иммунная тромбоцитопения или аутоиммунная гемолитическая анемия.



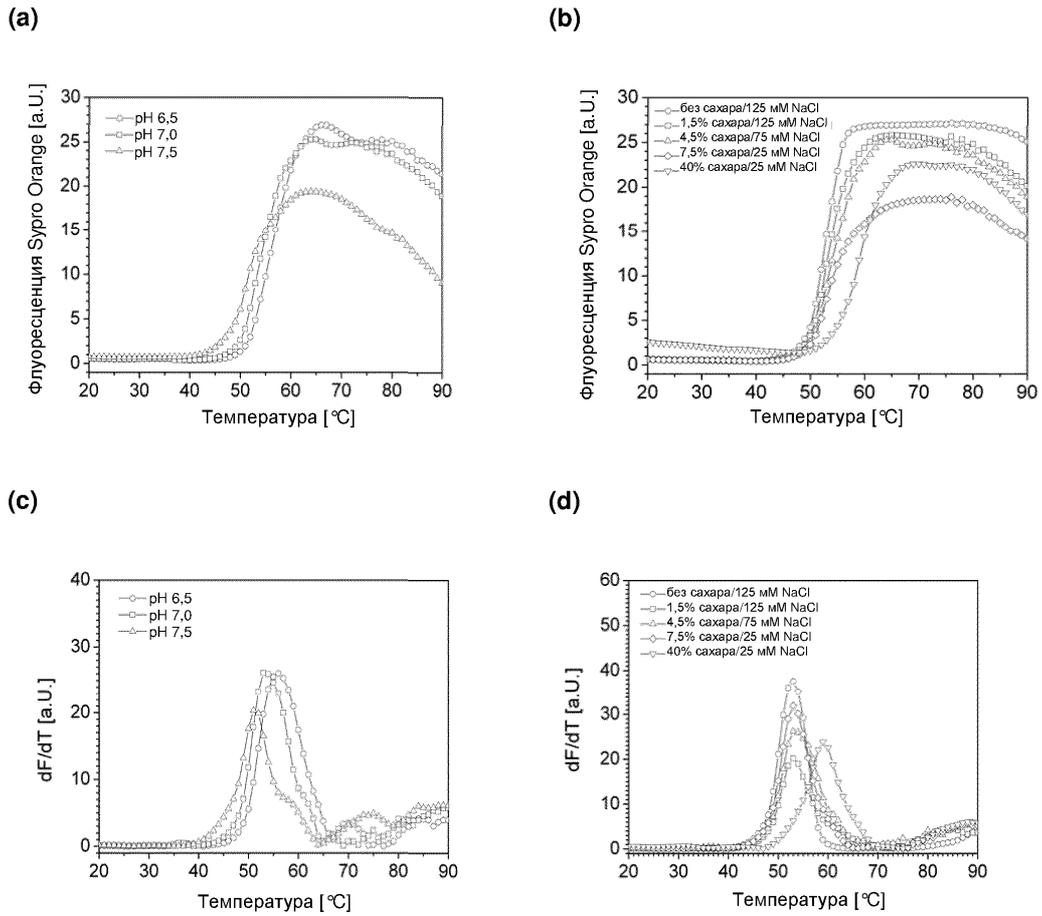
Фиг. 1



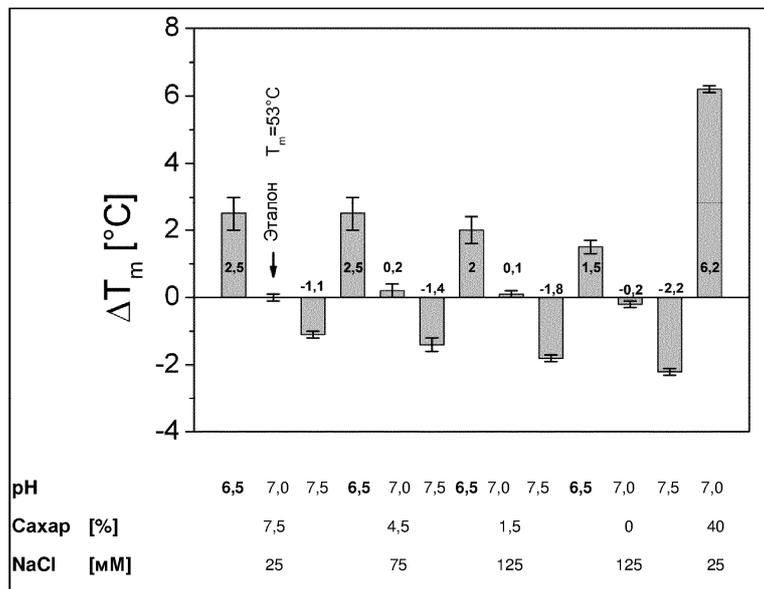
Фиг. 2



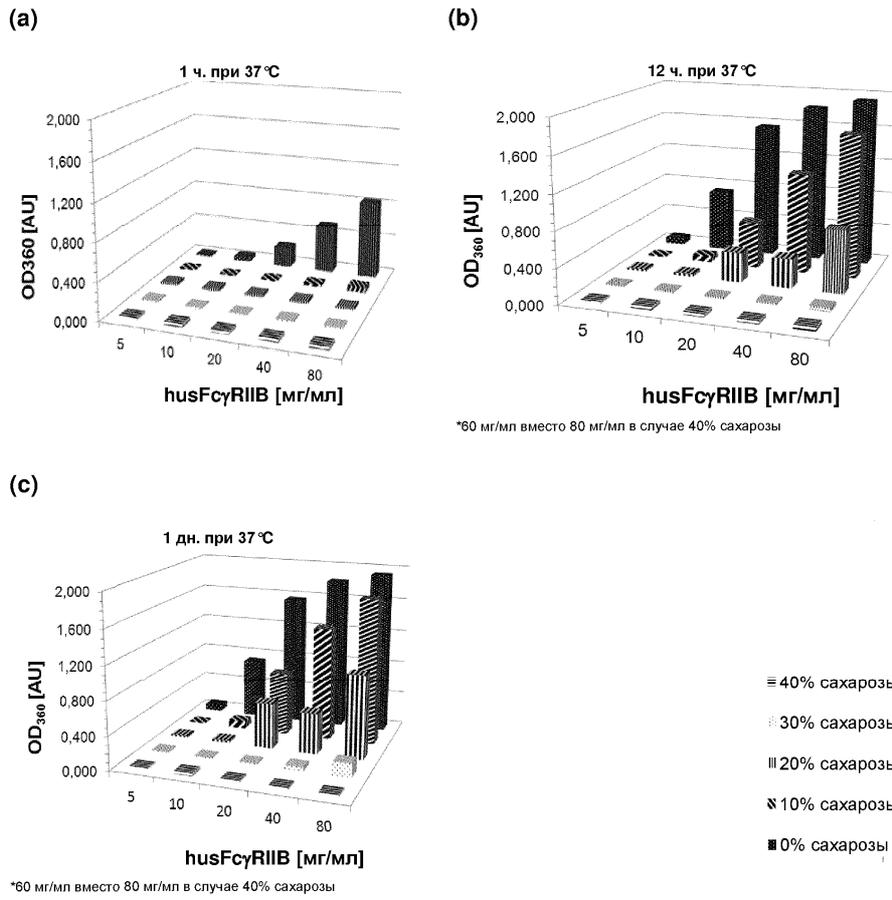
Фиг. 3



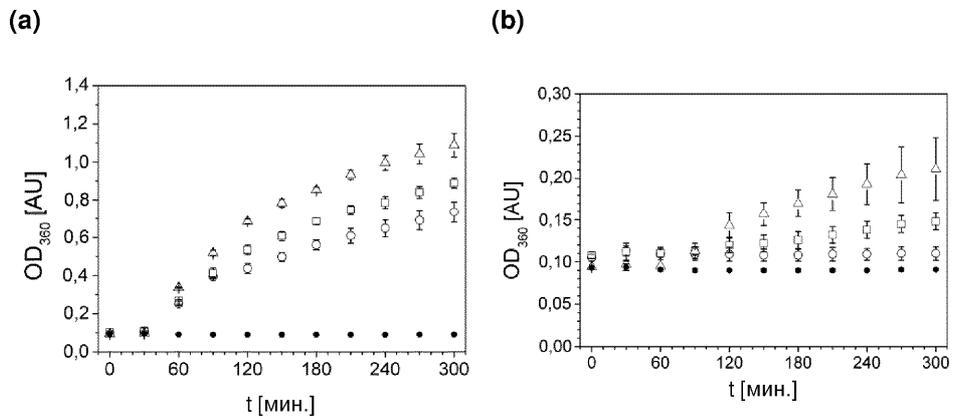
Фиг. 4



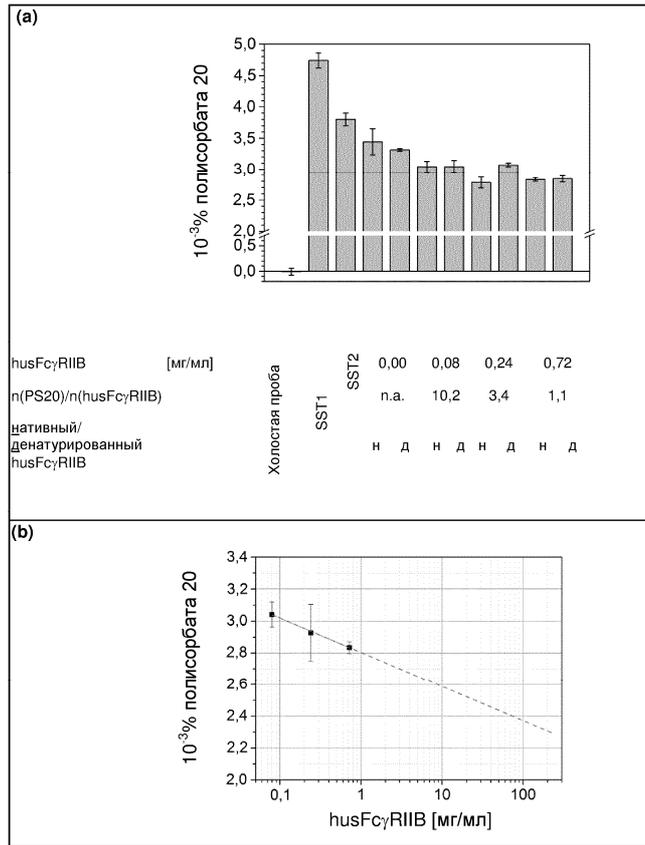
Фиг. 5



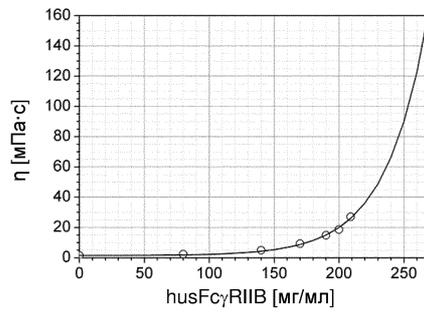
Фиг. 6



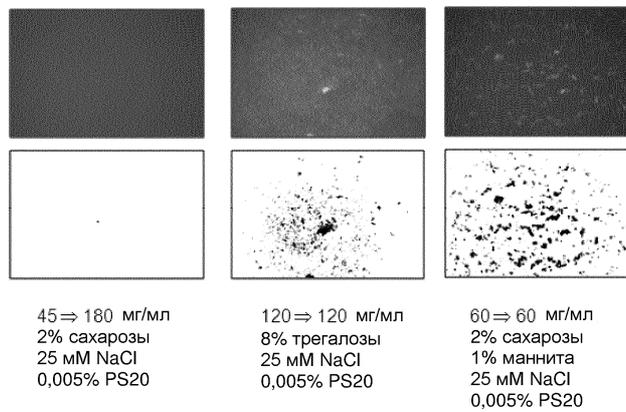
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

