

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092623** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.01

(22) Дата подачи заявки
2018.05.04

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)

(54) **СТАБИЛЬНЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ G-CSF, СЛИТОГО С ГИБРИДНЫМ Fc**

(86) PCT/TR2018/050208

(87) WO 2019/212429 2019.11.07

(88) 2020.03.12

(71) Заявитель:
**ИЛЬКОГЕН ИЛАЧ САНАЙИ ВЕ
ТИДЖАРЕТ А.Ш. (TR)**

(72) Изобретатель:

**Онджель Хатидже, Чапан Йилмаз,
Дагликоджа Дуйгу, Эрдоган Дагдаш
Хурие, Шахин Адем, Горбаджлу
Мельтем, Озкан Айлин, Саррачоглу
Нагехан (TR)**

(74) Представитель:

Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение предусматривает подходящую для введения, осуществляемого подкожным (п/к) путем, стабильную форму состава на основе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), слитого с гибридным Fc, содержащего (i) терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, (ii) буферную систему, (iii) по меньшей мере один стабилизатор, (iv) по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество и (v) необязательно пропиленгликоль в качестве органического растворителя.

202092623

A1

A1

202092623

P88763652EA

СТАБИЛЬНЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ G-CSF, СЛИТОГО С ГИБРИДНЫМ Fc**Область техники**

Настоящий состав относится к композициям на основе стабильного жидкого состава, содержащим молекулы Fc, слитого посредством пептидной связи с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF), подходящим для введения, осуществляемого подкожным (п/к) путем.

Уровень техники

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) представляет собой белок, необходимый для пролиферации и дифференцировки гранулоцитов, в частности нейтрофилов. Гранулоциты поглощают и уничтожают вторгающиеся микроорганизмы и клеточный детрит и, таким образом, имеют критическое значение для ответа на инфекцию. Однако их продолжительность жизни в кровотоке составляет только 6–12 часов, и они подвергаются разрушению во время своего функционирования. Как результат высокой скорости обновления популяции гранулоцитов, их количество быстро и значительно падает после повреждения костного мозга, например, после прохождения курса лечения с помощью традиционных средств лечения рака, включающих химиотерапевтические средства и лучевую терапию, или на фоне иммунологических нарушений, включающих СПИД (US 7208473 B2).

В последние годы повышение эффективности существующих в природе молекул или лекарственных средств посредством повышения их активности *in-vivo* и/или уменьшения побочных эффектов представляет большой интерес для многих ученых. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) представляет собой пример такой молекулы, лекарственные свойства которой изменяли с течением времени (*N. Nicola, Colony Stimulating Factors, vol. 49, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990*).

Рекомбинантный человеческий метионил-G-CSF (r-metHuG-CSF), представляющий собой белок, длина которого составляет 175 остатков, впервые был получен с использованием *E-coli* (*C.P. Hill, T.D. Osslund, D. Eisenberg, The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors, Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. 90, 1993, 5167-5171). В структуре белка имеются две дисульфидные связи и, как известно, один свободный цистеиновый остаток, Cys17. Cys17, протонируется при низком значении pH, и протонированная форма является важной для поддержания стабильности G-CSF (T. Arakawa, S.J. Prestrelski, L.O. Narhi, T.C. Boone, W.C. Kenney, Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed (J. Protein Chem. 12, 1993, 525-531)). Торговым названием r-metHuG-CSF является NEUPOGEN® (филграстим), и его применяют для лечения нейтропении, индуцированной терапией рака, при проведении процедур трансплантации костного мозга, при тяжелой врожденной нейтропении, апластической анемии, миелодиспластических синдромах и СПИДе (Фармакопейная статья на лекарственный препарат: Neupogen® (филграстим) – Amgen, Канада).

На замену филграстима с относительно коротким периодом полужизни (3,5–3,8 часов) пришел препарат NEULASTA® (пэгфилграстим), в котором G-CSF ковалентно связан с цепью полиэтиленгликоля, которая может повышать продолжительность циркуляции G-CSF в организме, при этом период его полужизни составляет 18–80 часов (Фармакопейная статья на лекарственный препарат: Neulasta® (ПЭГфилграстим)). Пэгилирование G-CSF не влияет на условия стабильности, в то время как для длительного хранения белка при 2–8°C все еще требуется значение pH, равное 4,0.

Другим способом повышения эффективности является применение иммуноглобулина в качестве платформы для слияния. Как описано в патенте США № 5045312, гормон роста человека конъюгируют с бычьим сывороточным альбумином или иммуноглобулином мыши с применением карбодиимида или глутаральдегида в качестве сшивающего агента. Конъюгаты обладают повышенной активностью по сравнению с немодифицированным гормоном роста.

Как известно, модификации Fc-домена, такие как изменение сайтов гликозилирования, улучшают терапевтический эффект (R. J. Sola and K. Griebenow, Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals might improve therapeutic role, J Pharm Sci. 2009 Apr; 98(4): 1223-1245). Более того, при слиянии активного вещества с соответствующей кристаллизующемуся фрагменту (Fc) областью антитела также удается достичь более продолжительной циркуляции или клинической активности. Добавление Fc-домена увеличивает гидродинамический радиус партнера по слиянию и

обеспечивает более длительную циркуляцию посредством взаимодействия с Fc-рецепторами, что в совокупности делает более трудным его выведение почками и увеличивает продолжительность его циркуляции (*D. M. Czajkowsky, J. Hu, Z. Shao, and R. J. Pleass. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives, EMBO Mol Med. 2012 Oct; 4(10): 1015-1028.*

Слитые белки с иммуноглобулином (Ig) в качестве платформы для слияния, как уже было упомянуто, подвергаются широкому изучению. Ig (hIg) человека подразделяют на классы IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, которые затем могут дополнительно делиться на подтипы, такие как IgG1 человека (hIgG1), IgG2 человека (hIgG2), IgG3 человека (hIgG3) и IgG4 человека (hIgG4) (*Roitt et al., Immunology 1989, Gower Medical Publishing, London, U. K.; New York, N.Y.*). Ig представляют собой гетеродимерные белки, которые состоят из четырех полипептидных цепей, представленных тяжелой цепью (HC) и легкой цепью (LC), связанных посредством дисульфидных связей. Как HC, так и LC состоят из вариабельной и константной областей. Константная область тяжелой цепи может быть дополнительно подразделена на три или четыре области (CH1, CH2, CH3 и CH4). В зависимости от изоформа Fc-часть константной области тяжелой цепи может состоять из шарнирной области, областей CH2, CH3 и/или CH4. IgG1, IgG2 и IgG4 характеризуются длительными периодами полужизни в сыворотке, составляющими 21 день, в то время как для других IgG их продолжительность составляет приблизительно неделю. Когда в образовании слитых белков задействована Fc-часть N-конца CH1-области IgG, N-конец Fc-области или C-конец CH3-области IgG, может быть достигнуто повышение стабильности и периода полужизни в сыворотке крови (*H. W. Schroeder, L. Cavacini, Structure and Function of Immunoglobulins, J Allergy Clin. Immunol. Feb 2010; 125 (202):41-52; Capon et al., Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy, Nature 1989; 337:525-531.*

Слитые белки на основе IgG могут быть образованы посредством слияния с внеклеточными доменами поверхностных клеточных рецепторов или с цитокинами и гормонами роста (*Capon et al., Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy, Nature 1989. 337: 525-531; Mohler et al., Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists, J. Immunology 1993. 151: 1548-1561.*

Однако, в отличие от слияния с внеклеточными доменами поверхностных клеточных рецепторов, слияние растворимых белков с IgG приводит к снижению разновидностей биологической активности по сравнению с неслитым цитокином или фактором роста. Причина состоит в том, что химерные белки существуют в виде димеров, где два активных белка находятся в непосредственной близости; причем это приводит к стерическому несоответствию при взаимодействии слитых IgG с их молекулами-мишенями. Следовательно, для получения эффективного слитого белка данная проблема должна быть преодолена (Слитые белки на основе иммуноглобулина, US 20120276097 A1).

Другое ограничение технологии слияния с Fc состоит в возникновении нежелательных иммунных ответов. Fc-домен иммуноглобулина также имеет эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимая цитотоксичность (CDC). Данные эффекторные функции, как правило, осуществляются путем взаимодействия между Fc-областью Ig и Fc-рецепторами (FcR) на эффекторных клетках или посредством связывания с компонентами системы комплемента. Следовательно, для снижения нежелательных ответов, таких как гибель клеток, высвобождение цитокинов или воспаление, необходимо провести блокирование эффекторных функций Fc (Слитые белки на основе иммуноглобулина, US 20120276097 A1).

В целом, известно, что использование продукта на основе G-CSF, такого как филграстим (Neupogen®), без какой-либо модификации является ограниченным ввиду его короткого периода полужизни. Пэгфилграстим (NEULASTA®) обладает сравнительно более продолжительным периодом полужизни, однако известно, что PEG может характеризоваться некоторыми побочными эффектами, а пэгилирование добавляет дополнительную стадию в ходе изготовления. Стратегии слияния с Fc обеспечивают возможность увеличить короткий период полужизни белков, однако одним из главных ограничений технологии слияния с Fc является наличие нежелательных иммунных ответов, как уже отмечалось. Платформа на основе гибридного Fc (hyFc), являющаяся молекулой, представляющей интерес, подлежащей тестированию на предмет составления и стабилизации согласно настоящему изобретению, была изобретена с целью дополнительного увеличения периода полужизни в плазме крови конъюгированных лекарственных средств и снижения

цитотоксичности и иммуногенности (EP 20080766022, US 8586038B2). Для данной цели генетически объединяли два разных иммуноглобулина, характеризующихся отсутствием индуцирования ADCC- и CDC-ответов. Гибридный Fc получали посредством процедур комбинирования подклассов IgG человека или комбинирования IgD и IgG человека. Гибридный Fc, присоединенный к биологически активной молекуле, является эффективным в отношении увеличения периода полужизни биологически активной молекулы в сыворотке крови, а также повышения уровня экспрессии полипептида, когда экспрессируется нуклеотид, кодирующий полипептид Fc-слитого белка. Таким образом, слитый с гибридным Fc (hyFc) G-CSF также характеризуется более продолжительным периодом полужизни в плазме крови, эффективным уровнем экспрессии, элиминированной цитотоксичностью и сниженной иммуногенностью (US 8586048 B2). В этой связи hy-Fc-слитый G-CSF, является уникальной и оригинальной молекулой, где Fc-часть сама по себе представляет собой две слитые молекулы иммуноглобулина, и эта первая слитая молекула является дополнительно слитой с активной молекулой. Так как данная структура требует уделения внимания стабильности как части слитого Fc, так и G-CSF-части, она отличается от других обычных Fc-слитых лекарственных средств и требует дополнительных отличающихся и уникальных растворов для обеспечения ее стабильности. В этой связи для целей настоящего изобретения было проведено изучение литературы, касающейся стабильности обычных Fc-слитых белков, однако само по себе настоящее изобретение было создано в соответствии с конкретными потребностями в отношении данного уникального hy-Fc-слитого G-CSF.

Как показали результаты обзора литературы, для обычных Fc-слитых лекарственных средств существуют различные растворы для составления. Отличающиеся биофизические и химические свойства рекомбинантного антитела и Fc-конъюгированных белков требуют применения составов в жидкой и лиофилизированной формах при pH (4,0–8,5), буферов (ацетатного, цитратного, фосфатного), стабилизаторов (солей, сахаров, аминокислот) и/или поверхностно-активных веществ (полисорбата 20 и полисорбата 80) для защиты их целостности и эффективности во время хранения (*S. M. Chamow, T. Ryll, B.H Lowman, and D. Farson, Eds., Therapeutic Fc-Fusion Proteins, Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, 2014*).

В отличие от интактных моноклональных антител (mAb), которые стабилизируются за счет меж- и внутримолекулярных взаимодействий Fc- и Fab-доменов; Fc-конъюгаты являются относительно нестабильными ввиду отсутствия междоменной стабильности (*A. L. Nelson., Antibody fragments, MAbs. 2010 Jan-Feb; 2(1): 77-83*). Более того, в наиболее вероятном случае существует более чем один путь разрушения Fc-слитого белка. Зачастую, один параметр состава, стабилизирующий молекулу в отношении защиты от разрушения, происходящего по одному пути, одновременно может стимулировать ее разрушение, происходящее по другому пути. Следовательно, установление оптимального состава композиции лекарственного средства на основе Fc-слитого белка одновременно является как довольно важной, так и сложной задачей.

Разработка состава требует определения физических и химических путей разрушения молекулы. Когда пути разрушения, имеющие решающее значение, определены, целью научного сотрудника, выполняющего составление, является разработка оптимальной композиции буфера для составления, содержащего буферное средство, стабилизатор и/или поверхностно-активное вещество.

Стабильность Fc-слитого белка в отношении химического и физического путей разрушения часто является максимальной в узком диапазоне значений pH (*S. M. Chamow, T. Ryll, B.H Lowman, and D. Farson, Eds., Therapeutic Fc-Fusion Proteins, Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, 2014*), следовательно, очень важным является выявление оптимальных значений pH. Помимо pH, стабилизирующие средства, такие как сахара (сахароза, трегалоза и/или многоатомные спирты), также являются важными компонентами составов на основе Fc-конъюгатов (*Gokarn et al. Excipients for Protein Dugs, Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery, 2006*). Кроме этого, поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, также играют важную роль в составах на основе белка. Эти поверхностно-активные вещества конкурируют с белками за взаимодействие с границей раздела, тем самым уменьшая поверхностное натяжение и вызываемое им повреждение белковых структур (*T. A.Khan, H-C. Mahler, R. S.K.Kishore, Eur. J. Pharm. Biopharm; 2015 Nov 97:60-67*).

Агрегация терапевтических средств на основе белка, как известно, происходит на каждой стадии: во время изготовления, составления, хранения, транспортировки и даже во время введения. Ввиду того, что такая агрегация белка представляет собой проблему

значительного масштаба для биофармацевтической индустрии, и несмотря на огромный технический прогресс за последние годы, она все еще продолжает являться одним из главных препятствий при разработке. Следовательно, способность прогнозировать, минимизировать, ограничивать и/или устранять агрегацию белка является критически важной для эффективного изготовления и составления биотерапевтических препаратов. К сожалению, контроль агрегации представляет собой весьма сложную задачу, поскольку механизмы агрегации протекают многочисленными путями. Несмотря на то, что о механизмах агрегации было накоплено много знаний, в настоящее время все еще невозможно надежно спрогнозировать склонность белка к агрегации. Однако посредством текущих моделей агрегации были идентифицированы два фактора, которые обуславливают стабильность; при этом один из них представляет собой коллоидную, а второй представляет собой конформационную стабильность.

Коллоидная стабильность определяется балансом межмолекулярных взаимодействий, основанных на отталкивании и притяжении между белковыми молекулами в растворе. Конформационная стабильность определяется разницей свободной энергии между свернутым и развернутым состояниями белковой молекулы. Таким образом, современные методики прогнозирования склонности белка к агрегации основываются на оценке конформационной и коллоидной стабильности. Они включают *in silico* прогнозирование, основанное на последовательности/структуре, и определение начала агрегации (T_m) в качестве индикаторов конформационной стабильности и определение осмотического второго вириального коэффициента (A_2) для измерения коллоидной стабильности.

Проводили систематический поиск информации для удовлетворения конкретных потребностей, связанных с уникальной и оригинальной молекулой лекарственного средства, представляющей собой hu-Fc-слитый G-CSF, что привело к созданию настоящего изобретения. С целью обеспечения для G-CSF-конъюгата пролонгированного действия стабильных жидких составов, способных обеспечивать сохранение химической и биофизической целостности активного вещества, был изобретен состав, содержащий буфер в определенном диапазоне значений pH, стабилизатор, поверхностно-активное вещество и/или органическую составляющую.

В настоящем изобретении оценивали стабильные составы на основе **G-CSF, СЛИТОГО С ГИБРИДНЫМ Fc**, и выполняли отбор таких стабильных составов на основании хроматографической и электрофоретической чистоты, значений A_2 и T_{onset} . Долгосрочная стабильность отобранных составов продемонстрирована с помощью примеров.

Описание задачи

Разработка типа состава, как описанный в данном документе для лекарственного средства на основе слитого белка, где для платформы и активного вещества, слитого с ней, требуются различные соотношения химической или биофизической стабильности, представляет собой сложную задачу. Необходимо также отметить, что по настоящему изобретению платформа для слияния hu-Fc (EP 20080766022, US 8586038B2) представляет собой уникальную и оригинальную молекулу, и отличается от других обычных Fc-платформ и, таким образом, требует отличных растворов для обеспечения ее стабильности. В частности, другие обычные Fc-платформы часто содержат Fc-область IgG2 или аналогичных иммуноглобулинов, и лекарственное средство является непосредственно слитым с данной одной Fc-областью иммуноглобулина. Однако hu-Fc-платформа представляет собой комбинацию подклассов IgD и IgG, где сама по себе Fc-часть иммуноглобулина представляет собой слитую структуру, и слияние лекарственного средства с данной иммуноглобулиновой частью образует вторую слитую структуру. В связи с этим все изобретения, раскрытые в данном документе, являются полностью специфичными по отношению к описанному лекарственному средству на основе hu-Fc-G-CSF и разрабатывались с учетом конкретных требований по обеспечению стабильности данной уникальной молекулы (US 8586048 B2).

В настоящем изобретении применяли hu-Fc-платформу и G-CSF, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, происходящей из гуманизированных организмов. Дополнительная реакция слияния не применялась, так как слияние между IgD и IgG и между G-CSF и иммуноглобулиновой частью обеспечивалось посредством единого генетического кода и единой реакции транскрипции-трансляции. Пептидная связь между G-CSF и hu-Fc-платформой образована между пролином и аргинином. Аминокислотная последовательность мономера hu-Fc-слитого G-CSF представлена ниже. Сигнальная последовательность, последовательность **G-CSF**, N-концевая

последовательность и последовательность hy-Fc указаны в соответствующем формате. Схематическое изображение белковой структуры hy-Fc-слитого G-CSF представлено на фигуре 1.

MAGPATQSPMKLMALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLKCLEQVRKIQQ
DGAALQEKLCA~~TY~~KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLS~~QL~~HSGL
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMP
AFA~~S~~A~~F~~QRRAGGV~~L~~VASHLQSFLEVSYRVLRHLAQPRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ
EERETKTPECPSHTQPLGVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWY
V~~D~~GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVY~~T~~LP~~P~~SQEEMTKN~~Q~~VSLTCLVKG~~F~~YPSDIAVEWESNGQPENN
YK~~T~~TPVLDS~~D~~GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K

В данном изобретении было обнаружено преимущественное влияние на стабильность молекулы гидролиза при более низких значениях pH (pH<5,0) в участке соединения с G-CSF и перетасовки дисульфидных связей при высоких значениях pH (pH>6,5), а также наличие у молекулы склонности к ним. G-CSF содержит две дисульфидные связи, образованные гомологичными цистеиновыми остатками, и дополнительный цистеиновый остаток в положении 17, который не может участвовать в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей. Дисульфидные связи в этих молекулах стабилизируют структуры и делают их устойчивыми к относительно агрессивным воздействиям (некоторые протеазы, высокие температуры, денатурирующие растворители, крайние значения pH), которые приводят к денатурации при сокращении количества дисульфидных связей (*Nicos A. Nicola, The waiter and Eliza Hall Institute of Medical Research, "Granulocyte Colony Stimulating Factor", p. 77-100*).

Более того, собственные исследования показали, что hy-Fc-слитый G-CSF является нерастворимым или труднорастворимым при значениях pH 5,3–6,0, и известно, что сам G-CSF является стабильным и активным при значениях pH около 4,0 (*T. Arakawa, S.J. Prestrelski, L.O. Narhi, T.C. Boone, W.C. Kenney, Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed, J. Protein Chem. 12 (1993) 525-531*). После точного определения решающего пути, приводящего к разрушению, цель, тем самым, состояла в обеспечении долгосрочной стабильности активной Fc-слитой молекулы.

Описание настоящего изобретения

Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение композиций на основе жидкого состава, содержащих молекулы G-CSF пролонгированного действия, слитые посредством пептидной связи с подобной моноклональному антителу платформой в виде гибридного Fc (hy-Fc). Состав для рекомбинантного человеческого G-CSF-hyFc по настоящему изобретению должен предусматривать в особенности подходящий уровень pH, стабилизатор, поверхностно-активное вещество и/или органический растворитель, что при этом обеспечивает высокую стабильность как связи между G-CSF и hy-Fc-платформой, так и внутри самой hy-Fc-платформы, не нарушая активности G-CSF и функционирования hy-Fc-платформы.

«Стабильный» состав или лекарственный препарат является таковым, содержащаяся в котором молекула G-CSF в значительной мере сохраняет свою биофизическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Стабильность составов, содержащих молекулу G-CSF, может быть измерена при выбранных температурах по истечении выбранных периодов времени.

Специалисту в данной области техники будет известно, что стабильность молекулы hy-Fc-слитого G-CSF сильно зависит от состава на ее основе и, следовательно, для поддержания стабильности лекарственного препарата крайне необходимо защитить его физическую и химическую целостность при хранении. Изменение чистоты, биофизических свойств и эффективности молекулы Fc-слитого G-CSF является главным индикатором стабильности и, таким образом, их мониторинг должен осуществляться при выбранных температурах по истечении определенных временных интервалов.

Настоящее изобретение относится к изобретению состава для лекарственного средства на основе hy-Fc-слитого G-CSF, представляющего собой оптимальную комбинацию буферного средства, и/или поверхностно-активного вещества, и/или стабилизирующего средства, и/или органического растворителя.

Жидкий состав в соответствии с настоящим изобретением предусматривает стабильную форму состава на основе гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), слитого с гибридным Fc, содержащего (i) терапевтически

эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, (ii) буферную систему, (iii) по меньшей мере один стабилизатор, и (iv) по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, и (v) необязательно пропиленгликоль в качестве органического растворителя, при этом значение pH препарата находится в диапазоне от 3,8 до 6,5, предпочтительно от 4,0 до 4,6.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое при введении живому субъекту оказывает требуемый эффект в отношении живого субъекта. Как правило, терапевтически эффективное количество G-CSF (документ по Neulasta Европейского агентства лекарственных средств) составляет 6 мг на одну процедуру применения. Терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, составляет 50–400 мкг/кг, предпочтительно 150–250 мкг/кг, при этом терапевтически эффективное количество G-CSF, находящегося в структуре G-CSF, слитого с гибридным Fc, составляет 20–160 мкг/кг, предпочтительно 50–100 мкг/кг. Для обеспечения данного терапевтического эффекта концентрация стабильной формы G-CSF, слитого с гибридным Fc, по настоящему изобретению составляет примерно от 10 мг/мл до 80 мг/мл и предпочтительно примерно от 20 мг/мл до 40 мг/мл.

«Стабилизирующее средство» способствует стабильности компонентов полипептида, тем самым поддерживая их терапевтическую эффективность. Сахара или сахароспирты могут также быть включены в стабилизированные жидкие полипептид-содержащие фармацевтические композиции по настоящему изобретению. Могут применяться любые сахара, такие как моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включающие, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, растворимый крахмал, гидроксиэтиловый крахмал и Na-карбоксиметилцеллюлозу. Сахароспирт представляет собой C4-C8-углеводород, содержащий —ОН-группу, и включает, например, маннит, сорбит, инозитол, галактитол, дульцит, ксилит и арабит. Указанные выше сахара или сахароспирты могут применяться по отдельности или в виде комбинации. Установленного предела для применяемого количества не имеется, при условии, что сахар или сахароспирт растворим в жидком препарате и не оказывает нежелательного влияния на стабилизирующие эффекты, достигаемые с применением способов по настоящему изобретению. Предпочтительная концентрация сахара или сахароспирта составляет от приблизительно 1,0% вес/об. до приблизительно

15,0% вес/об., предпочтительно от приблизительно 2,0% вес/об. до приблизительно 10,0% вес/об., более предпочтительно от 3,0% вес/об. до 7,0% вес/об. в пересчете на общий объем жидкого состава. Согласно настоящему изобретению стабилизатор представляет собой сорбит, при этом весовое соотношение сорбита и белка составляет от 3:2 до 7:2, предпочтительно 5:2.

Термин «буферная система» относится к одному или нескольким компонентам, которые при добавлении к водному раствору способны защищать раствор от варьирования значений pH при добавлении кислоты или щелочи или при разбавлении с помощью растворителя. Таким образом, буферный раствор играет важную роль в стабилизации hu-Fc-G-CSF в жидком составе. Могут использоваться ацетатный, фосфатный, глицинатный, карбонатный, цитратный, гистидиновый, трис-(гидроксиметил)-аминометановый (Трис) буферы и т. п., в случае чего ионы натрия, калия или аммония могут служить в качестве противоионов. Вышеуказанные буферы могут применяться по отдельности или в виде комбинации. «Кислота» представляет собой вещество, которое отдает ионы водорода в водном растворе. «Фармацевтически приемлемая кислота» включает неорганические и органические кислоты, которые являются нетоксичными в случае концентрации и способа, которые используют при их составлении. «Основание» представляет собой вещество, которое отдает гидроксильные ионы в водном растворе. «Фармацевтически приемлемые основания» включают неорганические и органические основания, которые являются нетоксичными в случае концентрации и способа, которые используют при их составлении. Согласно настоящему изобретению была выбрана буферная система, содержащая тригидрат ацетата натрия и уксусную кислоту/гидроксид натрия.

«Поверхностно-активное вещество» представляет собой поверхностно-активную молекулу, содержащую как гидрофобную часть (например, алкильную цепь), так и гидрофильную часть (например, карбоксильную и карбоксилатную группы). Поверхностно-активное вещество может быть добавлено в составы по настоящему изобретению. Поверхностно-активные вещества, подходящие для применения в составах по настоящему изобретению, выбирали из группы, состоящей из неионогенного поверхностно-активного вещества на основе полисорбата и неионогенного поверхностно-активного вещества на основе поллоксамера или их комбинации. Жидкий состав по настоящему изобретению может содержать сорбит в

качестве неионогенного поверхностно-активного вещества, предпочтительно в концентрации, составляющей от 0,08% (вес/об.) до 0,15% (вес/об.) в пересчете на общий объем жидкого состава.

Выражение «органический растворитель» относится в данном документе к пропиленгликолю (PG), представляющему собой полуполярный компонент, целью применения которого является подавление опосредованной кислотой реакции гидролиза, имеющей место при низких значениях pH, с помощью снижения содержания воды в пределах/в окружении белка. Пропиленгликоль, или 1,2-дигидроксипропан, или 1,2-пропандиол, представляет собой прозрачную, бесцветную, вязкую, практически не имеющую запаха жидкость с плотностью, составляющей 1,038 г/см³ при 20°C, и молекулярной массой, составляющей 76,095. Он способен смешиваться с водой, ацетоном и хлороформом, а также в них. Фармакопейные статьи на PG включены в Европейскую фармакопею, фармакопею США и фармакопею Японии; и его часто применяют в качестве вспомогательного вещества в ряде различных лекарственных средств; а также его применение одобрено в пищевых продуктах и косметических средствах (Справочный обзор вспомогательного вещества пропиленгликоль ЕМА/СНМР/334655/2013). Жидкий состав по настоящему изобретению может содержать пропиленгликоль в качестве органического растворителя в концентрации 20% (об./об.) или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава.

Способы выбора оптимальных составов на основе Fc-слитого G-CSF по настоящему изобретению

Значение pH для лекарственного препарата может быть определено с помощью потенциометрического анализа, описанного в статье <791> фармакопеи США.

Концентрация для каждого образца может быть определена с помощью УФ-теста путем измерения показателей поглощения при 280, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350 нм для каждого из них. От показателя общего поглощения при 280 нм отнимают показатель поглощения (при 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350 нм), обусловленный рассеиванием света. Концентрация белка в тестируемом растворе может быть рассчитана при помощи уравнения Ламберта-Бера с использованием скорректированных значений поглощения и значения коэффициента экстинкции, составляющего 1,03 мл/см*г.

Дифференциальная сканирующая калориметрия может быть применена в качестве методики для определения термодинамической стабильности белков. С ее помощью измеряют количество тепла, поглощенного или высвобожденного биомолекулами в растворе во время нагревания или охлаждения. Нативные белки отвечают на нагревание разворачиванием (термической денатурацией) при характеристической температуре (T_{onset}). Использование Nano DSC, TA Instruments (Нью-Касл, США), может быть предпочтительным способом определения температуры денатурации и энтальпии денатурации белков и других макромолекул в растворе, характеризующийся при этом универсальностью и точностью, достаточными для проведения скрининга молекулярной стабильности. Для этого образцы подвергали диализу против соответствующего буфера для составления и разбавляли до 1 мг/мл для дальнейшего использования в приборе для проведения DSC. Скорость сканирования составляла 1°C/мин. для нагревания и охлаждения при температурном диапазоне 20–100°C. Градиентное определение состава методом многоугольного статического рассеяния света, GC-MALS, может применяться для определения взаимодействий между белковыми молекулами в растворе с использованием изменений в рассеянии ими света при разных концентрациях. Второй вириальный коэффициент A_2 , являющийся характеристическим параметром для оценки межмолекулярных взаимодействий, может быть рассчитан с использованием серии показателей измерения светорассеяния. Систему CG-MALS Calypso II, Wyatt Technology Europe (Дернбах, Германия), применяют для снабжения MALS-детектора градиентом концентрации анализируемого вещества. Образец загружают в один поршневой насос системы, а буфер для диализа — в другой поршневой насос системы. Десять равноудаленных точек концентрации от 5 мг/мл до 0,5 мг/мл получают для каждого из измерений с помощью разбавления образца буфером для диализа. Для каждой градиентной точки 1 мл образца вводят в MALS-детектор. Полученный сигнал светорассеяния записывают в течение временного периода, составляющего 180 сек. Анализ диаграммы Цимма может быть проведен с использованием программного обеспечения Calypso версии 2.1.3.

Мутность образцов может быть определена с помощью турбидиметра 2100AN (Hach Lange, Дюссельдорф, Германия) в соответствии с Европейской фармакопеей. Калибровку системы выполняют с помощью смешивания сульфата гидразина и гексаметилентетрамина с получением первичной опалесцирующей суспензии, а затем последующего дополнительного разбавления стандарта опалесценции. При помощи

детектора измеряют рассеяние света под углом 90° от образца, а также отраженный свет перед образцом вместе со светом, проходящим непосредственно сквозь образец. Результаты измерений представляются в виде NTU, который представляет собой отношение измеренного рассеянного света под углом 90° к сумме значений компонентов отраженного и проходящего света.

Получение эталонного раствора для калибровки турбидиметра.

	I	II	III	IV
Стандарт опалесценции	5,00 мл	10,0 мл	30,0 мл	50,0 мл
Очищенная вода	95,0 мл	90,0 мл	70,0 мл	50,0 мл

Для тестирования идентичности и чистоты молекулы осуществляют мониторинг электрофоретических свойств hu-Fc-слитого G-CSF, представленных в виде показателей молекулярной массы и изоэлектрической точки.

Анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) может быть проведен для hu-Fc-слитого G-CSF для сравнения его молекулярной массы с молекулярной массой собственного стандартного образца. Лекарственный препарат и собственный стандартный образец разбавляют до 500 мкг/мл с применением деионизированной воды, и затем доводят до 3 мкг/20 мкл с использованием буфера для образца NuPAGE® LDS (4X) и деионизированной воды. Его загружают в 12 % Bis-Tris-гель NuPAGE® Novex 4 (1,0 мм, 10 лунок) для проведения электрофореза. Гель-электрофорез с применением изоэлектрического фокусирования может применяться для идентификации диапазона изоэлектрических точек hu-Fc-слитого G-CSF по отношению к собственному стандартному образцу. Лекарственный препарат и собственный стандартный образец разбавляют до 1 мг/мл с применением деионизированной воды и доводят до 10 мкг/20 мкл с применением буфера для образца (2X) Novex® IEF. Изоэлектрическое фокусирование проводят с применением геля для IEF Novex® с pH 3–10 (1,0 мм, 10 лунок).

Выделение hu-Fc-слитого G-CSF и мониторинг его чистоты с точки зрения свойств мономерности и гидрофобности можно осуществлять с помощью методик жидкостной хроматографии.

Эксклюзионная хроматография (SEC) может являться предпочтительным способом для разделения молекул на основании их размера на, как следствие, высокомолекулярные соединения (HMW) и подвергнувшиеся разрушению соединения с использованием 2695 Alliance HPLC (Waters). Разделение осуществляется посредством дифференциальной молекулярной эксклюзии или инклюзии во время того, как молекулы проходят по длине колонки. Лекарственное вещество разбавляют до 1 мг/мл и подвергают разделению с использованием колонки TSK-GEL G3000SWxL (7,8*300 мм) и предохранительной колонки TSK-GEL G3000SWxL (6*40 мм) (TOSOH Bioscience). Подвижная фаза состоит из 50 мМ фосфатного буфера: 5,34 г двухосновного фосфата натрия, 3,12 г одноосновного фосфата натрия, 8,76 г хлорида натрия в 1 л деионизированной воды, которые смешивают с ацетонитрилом в соотношении 9:1 (об./об.), в то время как конечное значение pH составляет 7,0. Поддерживают скорость потока 0,5 мл/мин. и длину волны детектора 214 нм в течение 30 мин. %-ную долю площади основного пика по отношению к общей площади рассчитывают в соответствии с результатом анализа, где выход указывает на мономерную чистоту.

Обращенно-фазовая высокоэффективная хроматография (RP-HPLC) может являться еще одним способом проверки чистоты посредством разделения их по принципу гидрофобности. RP-HPLC применяют для проверки наличия примесей и времени удерживания вариантов и усеченных форм Fc-слитого G-CSF с использованием 2695 Alliance HPLC (Waters). Лекарственное средство в концентрации 1 мг/мл в соответствующем буфере для составления разделяют с использованием колонки Vydac 214TP C4 (4,6 * 250 мм) (Grace, Vydac) и предохранительной колонки 214MS C4, 5 мкм, 7,5 * 4,6 мм (Grace, Vydac). Подвижная фаза состоит из 0,15% трифторуксусной кислоты (TFA) в деионизированной воде и 0,15% TFA в ацетонитриле при скорости потока, составляющей 0,5 мл/мин. Длину волны детектора, составляющую 220 нм, поддерживают в течение 35 минут, и осуществляют мониторинг %-ной доли площади основного пика по отношению к общей площади в соответствии с результатом анализа.

Более глубокое понимание настоящего изобретения может быть достигнуто с помощью следующих примеров, которые представлены для иллюстрации, но не должны рассматриваться в качестве ограничения настоящего изобретения. Данные примеры

описывают разработку жидкого состава, содержащего полноразмерный huFc-слитый G-CSF, описанный в US 8586048 B2.

ПРИМЕР 1. Выбор оптимального значения pH и буферного компонента для состава на основе huFc-слитого G-CSF

Буферный реагент необходим для поддержания целевого значения pH и стабильности белка, при которых, как известно, обеспечивается его активность. Для целей жидкого состава по настоящему изобретению буферы изначально проверяли посредством измерения начала денатурации (T_{onset}) в качестве индикатора конформационной стабильности и определения осмотического второго вириального коэффициента (A_2) в качестве показателя коллоидной стабильности.

Согласно данному изобретению для составления образцов составы получали с помощью диализа. Лекарственное вещество загружали в заранее подготовленные пробирки для диализа и инкубировали в течение 2 часов в буфере для составления. Через 2 часа буфер для составления заменяли и образцы инкубировали в течение 2 часов в свежем буфере. Диализ завершали за ночь с помощью инкубации образцов в свежем буфере для составления. После диализа образцы удаляли из пробирки для диализа и проводили проверку значения pH, а также концентрации образцов. В случае необходимости значение pH регулировали с помощью кислоты или основания фармацевтической степени чистоты. В случае необходимости концентрацию регулировали с помощью разбавления или концентрирования с помощью ультрафильтрации.

Предварительные лабораторные измерения проводили в рамках исследования скрининга состава для осуществления мониторинга коллоидной стабильности, измерявшейся с помощью способа градиентного определения состава методом многоуглового статического рассеяния света (CG-MALS), и термодинамических свойств, измерявшихся с помощью дифференциального сканирующего калориметра (DSC), 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF в 10 mM ацетате натрия при pH, составляющем 3,8, 4,2, 4,6 и 5,2; 10 mM гистидине-хлористоводородной кислоте при pH, составляющем 5,2, 6,5 и 7,0; 10 mM фосфата натрия при pH, составляющем 6,5 и 7,5; 10 mM ацетате гистидина при pH, составляющем 6,5 и 7,0; 10 mM Трис-

хлористоводородной кислоте при рН, составляющем 7,5, и 10 мМ Трис-ацетате при рН, составляющем 7,5.

Таблица 1. Оценка конформационной и коллоидной стабильности 20 мг/мл γ -Fc-слитого G- CSF при различных значениях рН и буферных компонентах

рН	Буфер [10 мМ]	A_2 [моль*мл*г ⁻²]	T_{onset} {°C}
3,8	Na/ацетат	63,7	45,6
4,2	Na/ацетат	15,3	48,7
4,6	Na/ацетат	5,87	52
5,2	Na/ацетат	-2,7	50,9
5,2	His/HCl	-1,99	50,6
6,5	His/HCl	1,04	52,6
6,5	His/ацетат	2,7	53,5
6,5	NaPO ₄	-1,66	54,4
7	His/HCl	15	55
7	His/ацетат	13,9	54,6
7,5	Трис/HCl	3,03	54,2
7,5	NaPO ₄	0,58	50,1
7,5	Трис/ацетат	2,68	54,9

В соответствии с результатами, представленными в таблице 1, наблюдали, что повышение рН повышало значение T_{onset} и значение T_{onset} было выше, чем 40°C при всех исследуемых значениях рН. С другой стороны, значение A_2 было отрицательным при рН, составляющем 5,2 (с применением Na/ацетата, His/HCl в качестве буферов), рН, составляющем 6,5 (с применением NaPO₄ в качестве буфера). Отрицательное значение A_2 указывало на коллоидную нестабильность. При условиях, близких к рI-значению для γ -Fc-слитого G-CSF (рН 5,3–6,0), наблюдали взаимодействия между молекулами, характеризующиеся меньшим отталкиванием и даже притяжением. В диапазоне значений рН от 6,5 до 7,0 обнаруживали более высокую коллоидную стабильность в буферных системах на основе гистидина-хлористоводородной кислоты и гистидина-ацетата, чем в системах на основе фосфата натрия. Таким образом, согласно настоящему изобретению, на основании значений A_2 и значений T_{onset} было обнаружено, что условия, где значение рН составляло 3,8 (Na/ацетат), 4,2 (Na/ацетат),

4,6 (Na/ацетат), 6,5 (His/ацетат) и 7,5 (His/ацетат), были более благоприятными для коллоидной и термодинамической стабильности hu-Fc-слитого G-CSF.

ПРИМЕР 2. Оценка влияния добавления хлорида натрия на стабильность состава на основе huFc-слитого G-CSF

Влияние другого вспомогательного вещества для составления на значения T_{onset} и A_2 выбранного состава изучали в рамках дополнительных исследований с применением составов, забуференных с помощью Na/ацетата с pH, составляющим 4,2, и забуференных с помощью His/ацетата с pH, составляющим 6,5, где за основу были взяты результаты, представленные в примере 1. Для целей данного исследования в качестве системы упаковки был выбран контейнер с кремнийорганическим покрытием. Предварительно простерилизованные стеклянные шприцы объемом 1 мл с кремнийорганической смазкой заполняли материалом образцов при ламинарном потоке. Пробки устанавливали с помощью машины для укупоривания. Сначала для оценки эффекта тоничности в отношении стабильности в состав добавляли солевой компонент в виде 150 мМ хлорида натрия. Затем проводили оценку коллоидной и конформационной стабильности, как было описано выше.

Таблица 2. Оценка коллоидной и конформационной стабильности 20 мг/мл huFc-слитого G-SF в составах, содержащих 150 мМ хлорида натрия

pH	Буфер	Хлорид натрия	A_2 [моль*мл*г ⁻²]	T_{onset} {°C}
	[10 мМ]	[мМ]		
4,2	Na/ацетат	0	15,3	48,7
4,2	Na/ацетат	150	-0,77	43
6,5	His/ацетат	0	2,7	53,5
6,5	His/ацетат	150	-0,58	54,9

Добавление хлорида натрия привело к увеличению ионной силы, однако не оказывало четко выраженного эффекта в отношении термодинамической стабильности. В соответствии с результатами, представленными в таблице 2, добавление хлорида натрия обуславливало снижение значений A_2 . Данные значения указывали на то, что более высокая изотоническая сила не являлась благоприятной ввиду снижения имеющегося взаимодействия отталкивания и отсутствия четко выраженного эффекта в

отношении конформационной стабильности. Таким образом, составы по настоящему изобретению не содержат солевого компонента.

ПРИМЕР 3. Оценка влияния добавления сорбита на стабильность выбранных составов на основе hFc-слитого G-CSF

Сорбит, среди прочего, оценивали в качестве кандидатного стабилизатора, поскольку многие другие кандидаты не демонстрировали долгосрочную стабильность при низких значениях pH. Сорбит (5%) добавляли в состав, а затем измеряли значения T_{onset} и A_2 .

Таблица 3. Оценка коллоидной и конформационной стабильности 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF в составах, содержащих 5% сорбит

pH	Буфер [10 мМ]	Стабилизатор 5%	A_2 [моль*мл*г ⁻²]	T_{onset} {°C}
4,2	Na/ацетат	-	15,3	48,7
4,2	Na/ацетат	Сорбит	15,7	49,9
6,5	His/ацетат	-	2,7	53,5
6,5	His/ацетат	Сорбит	1,87	53,5

В соответствии с результатами, приведенными в таблице 3, присутствие сорбита оказывало легкий стабилизирующий эффект в отношении конформации при значении pH, составляющем 4,2, но не оказывало какого-либо эффекта при значении pH, составляющем 6,5. Следовательно, согласно настоящему изобретению наличие стабилизатора является необходимым для достижения требуемой коллоидной и термической стабильности. Предпочтительным стабилизатором по настоящему изобретению является 5% сорбит фармацевтической степени чистоты.

ПРИМЕР 4. Оценка эффекта поверхностно-активного вещества в отношении выбранных составов

Для определения оптимального поверхностно-активного вещества к составам, предусматривающим 10 мМ ацетата натрия при значении pH, составляющем 4,2, и гистидин-ацетат при значении pH, составляющем 6,5, с 5% сорбитом, добавляли либо 0,1% полоксамер 188 (P188), либо 0,02% полисорбат 20 (PS20), либо 0,02% полисорбат 80 (PS80). Данные жидкие составы на основе hFc-слитого G-CSF, приведенные в таблице 4, подвергали ускоренным исследованиям стабильности при 40°C в течение 2

недель с целью определение потенциальной стабильности белка за пределами его срока хранения. Данные ускоренные исследования обычно проводят при температурах, превышающих таковые для рекомендованных условий хранения, и данные затем применяют для приблизительного расчета энергии активации для реакций разрушения, принимая за основу кинетику Аррениуса (Cleland et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993)). Значение энергии активации затем применяли для расчета ожидаемого срока хранения состава на основе белка при рекомендованных условиях хранения. Кроме этого, стабильность составов (таблица 4) оценивали при нагрузке в виде замерзания-оттаивания. Мониторинг стабильность осуществляли в отношении мутности, мономерной и гидрофобной чистоты и электрофоретичности с учетом молекулярной массы и изоэлектрической точки.

Таблица 4. Матрица состава для определения оптимального поверхностно-активного вещества для составов, содержащих 20 мг/мл huFc-слитого G-CSF

Составы	pH	Буфер	Стабилизатор	Поверхностно-активное вещество	Система упаковки
Состав 1 (F1)	4,2	10 мМ Na/ацетат	5% сорбит	-	
Состав 2 (F2)	4,2	10 мМ Na/ацетат	5% сорбит	+ 0,1% P188	Шприц с кремнийорганическим покрытием
Состав 3 (F3)	4,2	10 мМ Na/ацетат	5% сорбит	+ 0,02% PS20	
Состав 4 (F4)	4,2	10 мМ Na/ацетат	5% сорбит	+ 0,02% PS80	
Состав 5 (F5)	6,5	10 мМ His/ацетат	5% сорбит	-	
Состав 6 (F6)	6,5	10 мМ His/ацетат	5% сорбит	+ 0,1% P188	Шприц с кремнийорганическим покрытием
Состав 7 (F7)	6,5	10 мМ His/ацетат	5% сорбит	+ 0,02% PS20	
Состав 8 (F8)	6,5	10 мМ His/ацетат	5% сорбит	+ 0,02% PS80	

Результаты показывали, что все составы являются устойчивыми к нагрузке в виде замерзания-оттаивания (таблицы 5–10). Также вариантом осуществления настоящего изобретения является то, что составы, содержащие полксамер 188 (P188), демонстрировали более высокую стабильность, чем составы, содержащие полисорбат

20 (PS20) и полисорбат 80(PS80), и контрольные составы в условиях ускоренного исследования стабильности (40°C в течение 2 недель) (таблица 5–10). Следовательно, полуксамер 188, или Pluronic F68, включали в настоящее изобретение в качестве поверхностно-активного вещества с целью минимизации риска агрегации huFc-слитого G-CSF в условиях хранения и транспортировки.

Таблица 5. Результаты исследования мутности F1–F4 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде заморзания-оттаивания, n=4

	Мутность [NTU]							
	F1		F2		F3		F4	
	Среднее значение	SD						
t=0	4,6	0,6	4,0	0,6	3,0	0,5	2,9	0,6
Заморзание/оттаивание	4,2	0,6	3,9	0,3	4,0	0,4	4,1	0,1
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	6,2	1,3	5,5	0,8	6,5	0,4	6,4	0,7

Таблица 6. Результаты исследования мутности F5–F8 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде заморзания-оттаивания, n=4

	Мутность [NTU]							
	F5		F6		F7		F8	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
t=0	7,3	0,4	6,9	1,0	7,6	0,7	7,0	0,8
Заморзание/оттаивание	7,4	0,9	7,5	1,1	7,8	0,2	6,7	0,5
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	85,5	33,7	97,7	3,6	113,2	13,8	105,2	16,3

Таблица 7. Процентное содержание мономеров в F1–F4 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде заморзания-оттаивания, установленное с помощью SEC-HPLC, n = 4

	Отн. содержание мономеров [%]							
	F1		F2		F3		F4	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
t=0	99,5	0,1	99,5	0,1	99,4	0,1	99,4	0,2

Замерзание/оттаивание	98,5	0,9	98,5	0,6	98,9	0,4	98,8	0,2
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	85,7	0,9	86,3	1,4	58,9	0,5	66,5	0,5

Таблица 8. Процентное содержание мономеров в F5–F8 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде замерзания-оттаивания, установленное с помощью SEC-HPLC, n = 4

	Отн. содержание мономеров [%]							
	F5		F6		F7		F8	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
t=0	98,5	0,7	98,1	0,7	98,6	0,4	98,3	0,6
Замерзание/оттаивание	98,2	0,7	98,1	0,7	98,4	0,3	98,1	0,6
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	50,3	0,4	49,0	0,2	25,1	0,2	26,7	0,8

Таблица 9. Процентное содержание гидрофобных молекул в F1–F4 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде замерзания-оттаивания, установленное с помощью RP-HPLC, n = 4

	Отн. содержание соответствующего основному пику вещества [%]							
	F1		F2		F3		F4	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
t=0	97,0	0,1	96,7	0,3	96,5	0,1	96,7	0,1
Замерзание/оттаивание	96,8	0,1	96,8	0,1	96,3	0,2	96,5	0,1
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	86,5	0,1	87,4	0,1	69,3	0,1	76,6	0,2

Таблица 10. Процентное содержание гидрофобных молекул в F5–F8 при 40°C в течение 2 недель и при нагрузке в виде замерзания-оттаивания, установленное с помощью RP-HPLC, n = 4

	Отн. содержание соответствующего основному пику вещества [%]							
	F5		F6		F7		F8	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
t=0	96,6	0,1	96,5	0,1	96,4	0,1	96,5	0,1
Замерзание/оттаивание	96,5	0,1	96,4	0,0	96,4	0,0	96,4	0,1
Термическая нагрузка (2 недели при 40°C)	64,0	1,4	63,3	0,5	41,2	0,7	41,3	0,3

В ходе того же исследования в составах, характеризующихся значением pH, составляющим 4,2, и его подвариантами, основные продукты разрушения представляли собой фрагменты, вероятнее всего образовавшиеся в результате гидролиза. При значении pH, составляющем 6,5, и его подвариантах обнаруживались агрегаты, связанные при помощи ковалентной связи, образованные в результате перетасовки дисульфидных связей (фигуры 2 и 3).

ПРИМЕР 5. Оптимизация и долгосрочная оценка выбранного состава

Состав 2 (таблица 4) выбирали как наиболее стабильный состав среди подвергнутых скринингу составов, и его условно обозначали как состав 2А. С другой стороны, множество исследований показали, что небольшое изменение значения pH состава могло иметь критическое значение для стабильности состава. Для определения эффекта изменения pH и долгосрочных исследований стабильности выбранных составов перечисленные в таблице 11 (состав 2А) и таблице 12 (состав 2В) составы получали с изменением значений pH на 4,2 и 4,6 соответственно. В данном случае изменения значения pH достигали с помощью добавления фармацевтически приемлемой кислоты или основания. В данном случае предпочтительной кислотой являлась уксусная кислота, а предпочтительным основанием являлся гидроксид натрия.

Таблица 11. Композиция состава 2А, забуференного при pH 4,2

Функция	Компонент	Количество на мл
Активный ингредиент	hu-Fc-слитый G-CSF	20 мг
Стабилизатор	Сорбит	50 мг
Поверхностно-активное вещество	Полоксамер 188 (Pluronic F68)	1 мг
Буферное средство	Тригидрат ацетата натрия	0,16 мг
Буферное средство	Уксусная кислота/гидроксид натрия	q.s.*

* В достаточном количестве

Таблица 12. Композиция состава 2В, забуференного при pH 4,6

Функция	Компонент	Количество на мл
Активный ингредиент	hy-Fc-слитый G-CSF	20 мг
Стабилизатор	Сорбит	50 мг
Поверхностно-активное вещество	Полоксамер 188 (Pluronic F68)	1 мг
Буферное средство	Тригидрат ацетата натрия	0,16 мг
Буферное средство	Уксусная кислота/гидроксид натрия	q.s.*

* В достаточном количестве

Перед проведением исследования стабильности исследовали термодинамическую и коллоидную стабильность полученных составов (таблица 13).

Таблица 13. Коллоидные и термодинамические свойства составов 2А и 2В

Состав	A_2 [10^{-4} моль*мл*г $^{-2}$]	T_{onset} {°C}
Состав 2А	21,1	53,6
Состав 2В	5,1	51,2

В Руководстве по испытанию стабильности Европейского агентства по оценке лекарственных средств указано, что в случаях, когда требуемый срок хранения составляет более шесть месяцев, в момент подачи заявки на регистрацию должны быть предоставлены данные о стабильности за период, составляющий минимум шесть месяцев. Следовательно, испытание стабильности в режиме реального времени в реальных условиях проводили при 2–8°C, ускоренное исследование стабильности проводили при 25°C в течение 6 месяцев. Результаты приведены в таблицах 14–17.

Таблица 14. Процентное содержание мономеров в составах 2А и 2В, установленное с помощью SEC-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь пика, соответствующего мономеру, определенная с помощью SEC-HPLC [%]	
	Состав 2А	Состав 2В
t=0	98,9	98,7
2 недели	98,9	98,8
1 месяц	98,5	98,5

3 месяца	98,5	98,6
6 месяцев	98,6	98,6

Таблица 15. Процентное содержание мономеров в составах 2А и 2В, установленное с помощью SEC-HPLC при 25°C, (n=2)

25°C	Отн. площадь пика, соответствующего мономеру, определенная с помощью SEC-HPLC [%]	
	Состав 2А	Состав 2В
t=0	98,9	98,7
2 недели	98,8	98,9
1 месяц	98,7	98,7
3 месяца	99,0	97,8
6 месяцев	83,8	81,8

Таблица 16. Процентное содержание гидрофобных молекул в составах 2А и 2В, установленное с помощью RP-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью RP-HPLC [%]	
	Состав 2А	Состав 2В
t=0	97,2	97,5
2 недели	97,1	97,1
1 месяц	97,0	97,0
3 месяца	96,7	96,6
6 месяцев	96,1	96,3

Таблица 17. Процентное содержание гидрофобных молекул в составах 2А и 2В, установленное с помощью RP-HPLC при 25°C (n=2)

25°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью RP-HPLC [%]	
	Состав 2А	Состав 2В
t=0	97,2	97,5
2 недели	96,0	96,0
1 месяц	95,0	94,7
3 месяца	90,8	89,6
6 месяцев	86,3	84,6

Было продемонстрировано, что составы 2А и 2В сохраняли стабильность по меньшей мере в течение 6 месяцев в режиме реального времени и реальных температурных

условий (таблицы 14–17). Таким образом, в настоящем изобретении обнаружили, что составы, характеризующиеся как значением pH, составляющим 4,2, так и значением pH, составляющим 4,6, обеспечивали долгосрочную стабильность hu-Fc-слитого G-CSF в режиме реального времени и реальных условий и в условиях ускоренных исследований стабильности.

ПРИМЕР 6. Оценка эффекта органического растворителя в отношении стабильности состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF

Настоящий состав обеспечивает разработку улучшенного состава для предотвращения разрушения, обусловленного расщеплением содержащейся в нем молекулы G-CSF, и дальнейшего распада с применением органического растворителя пропиленгликоля (PG).

Во время разработки состава проводили оценку влияния значения pH и присутствия пропиленгликоля на стабильность hu-Fc-слитого G-CSF (таблица 18).

Таблица 18. Матрица исследования по оценке влияния значения pH и присутствия пропиленгликоля на стабильность 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF

Обозначение состава	pH	Обозначение состава + процентное содержание пропиленгликоля (PG)	Система упаковки
F2A	4,2	Только состав 2A	Шприц с кремнийорганическим покрытием
F2A+10PG	4,2	Состав 2A + 10% PG	
F2A+20PG	4,2	Состав 2A + 20% PG	
F2B	4,6	Только состав 2B	
F2B+10PG	4,6	Состав 2B + 10% PG	
F2B+20PG	4,6	Состав 2B + 20% PG	

Стабильность hu-Fc-слитого G-CSF исследовали при значениях pH, составляющих 4,2 и 4,6, в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, содержащем 0,01% Pluronic F-68 и 5% сорбит, и при наличии или отсутствии 10% PG или 20% PG. Образцы, содержащие 20 мг/мл активного ингредиента, хранили при 25°C и 2–8°C в течение 6 месяцев. Перед проведением исследования стабильности исследовали проходимость через иглу шприца, а также термодинамическую и коллоидную стабильность составов (таблица 19).

Таблица 19. Коллоидные и термодинамические свойства составов 2А и 2В после замены органического растворителя

Состав	A₂ [10⁻⁴ моль*мл*г⁻²]	T_{onset} {°C}
F2A	21,1	53,6
F2A+10PG	22,7	50,5
F2A+20PG	19,9	45,2
F2B	5,1	51,2
F2B+10PG	5,0	47,6
F2B+20PG	4,7	45,0

В одном варианте осуществления настоящего изобретения необходимая для выталкивания сила для всех составов была ниже 10 Н и, таким образом, являлась приемлемой для лекарственного средства, вводимого путем инъекции. Составы, содержащие пропиленгликоль, демонстрировали незначительно большую силу, необходимую для выталкивания, по сравнению с составами без пропиленгликоля. Значение рН не оказывало влияния на результаты.

В соответствии с результатами, приведенными в таблице 19, коллоидная стабильность hu-Fc-слитого G-CSF является более высокой при более низких значениях рН. Присутствие 10% пропиленгликоля незначительно повышает взаимодействия отталкивания белковых молекул и, таким образом, коллоидную стабильность, при этом 20% пропиленгликоль не оказывает такого действия. Термодинамическая стабильность hu-Fc-слитого G-CSF также незначительно повышалась при низких значениях рН.

В другом варианте осуществления в ходе того же исследования обнаруживали, что главным путем разрушения hu-Fc-слитого G-CSF являлся химическое разрушение и фрагментация, так как полученные данные показывали, что снижение уровня мономеров было обусловлено повышением содержания низкомолекулярных примесей (таблица 21). Агрегацию, обусловленную перетасовкой дисульфидных связей в hu-Fc-слитом G-CSF, не наблюдали в ходе того же исследования.

В заключительном варианте осуществления того же исследования было продемонстрировано, что добавление пропиленгликоля оказывало благоприятное влияние на химическую стабильность, как было представлено с помощью данных, полученных в ходе ускоренных исследований стабильности (таблицы 20–23). Однако

20% PG снижал термодинамическую стабильность (таблица 19), и, таким образом, добавление 10% PG являлось более предпочтительным.

Таблица 20. Процентное содержание мономеров для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью SEC-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь пика, соответствующего мономеру, определенная с помощью SEC-HPLC [%]					
	F2A	F2A+10PG	F2A+20PG	F2B	F2B+10PG	F2B+20PG
t=0	98,9	98,7	98,8	98,7	98,6	98,3
2 недели	98,9	98,8	98,9	98,8	98,7	98,5
1 месяц	98,5	97,0	98,7	98,5	98,5	98,2
3 месяца	98,5	98,5	98,7	98,6	98,3	98,3
6 месяцев	98,6	98,5	98,8	98,6	98,3	98,2

Таблица 21. Процентное содержание мономеров для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью SEC-HPLC при 25°C, (n=2)

25°C	Отн. площадь пика, соответствующего мономеру, определенная с помощью SEC-HPLC [%]					
	F2A	F2A+10PG	F2A+20PG	F2B	F2B+10PG	F2B+20PG
t=0	98,9	98,7	98,8	98,7	98,6	98,3
2 недели	98,8	98,9	99,4	98,9	98,8	99,0
1 месяц	98,7	98,9	99,2	98,7	98,6	98,4
3 месяца	99,0	99,2	98,9	97,8	99,1	98,0
6 месяцев	83,8	84,7	85,6	81,8	82,8	83,3

Таблица 22. Процентное содержание гидрофобных молекул для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью RP-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью RP-HPLC [%]					
	F2A	F2A+10PG	F2A+20PG	F2B	F2B+10PG	F2B+20PG
t=0	97,2	97,1	97,4	97,5	97,5	97,5
2 недели	97,1	97,2	97,2	97,1	97,2	97,2
1 месяц	97,0	96,8	97,1	97,0	97,2	97,1
3 месяца	96,7	96,8	96,9	96,6	96,9	96,9
6 месяцев	96,1	96,4	96,4	96,3	96,5	96,4

Таблица 23. Процентное содержание гидрофобных молекул для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью RP-HPLC при 25°C, (n=2)

25°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью RP-HPLC [%]					
	F2A	F2A+10PG	F2A+20PG	F2B	F2B+10PG	F2B+20PG
t=0	97,2	97,1	97,4	97,5	97,5	97,5
2 недели	96,0	96,1	96,3	96,0	95,9	96,3
1 месяц	95,0	95,1	95,6	94,7	95,0	95,2
3 месяца	90,8	91,0	91,4	89,6	90,3	90,9
6 месяцев	86,3	87,1	88,0	84,6	86,0	87,3

Обнаруживали, что стабильность составов, приведенных в таблице 18, сохранялась в течение по меньшей мере 6 месяцев в режиме реального времени, реальной температуры и в условиях ускоренных исследований стабильности. И при этом добавление PG оказывало благоприятный эффект в отношении химической стабильности составов. Таким образом, присутствие PG могло бы обеспечивать возможность предотвращения разрушения, обусловленного расщеплением G-CSF, что можно установить из изменения гидрофобной чистоты при 25°C, мониторинг которой проводили с помощью RP-HPLC (таблица 23). Таким образом, в настоящем изобретении было обнаружено, что добавление PG в концентрации 20% или меньше в качестве органического растворителя дополнительно повышает долгосрочную стабильность hu-Fc слитого G-CSF в режиме реального времени, реальной температуры и в условиях ускоренных исследований стабильности.

ПРИМЕР 7. Дополнительная оценка эффекта значения pH в отношении стабильности в режиме реального времени состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF

С целью полного изучения эффекта значения pH в отношении стабильности в режиме реального времени hu-Fc-слитого G-CSF проводили исследование составов с pH, составляющим 4,0, и pH, составляющим 4,4, с содержанием и без содержания 10% пропиленгликоля (PG) (таблица 19) при 2–8°C в течение 6 месяцев.

Активный ингредиент, представленный 20 мг/мл hu-Fc-слитого с G-CSF, исследовали при значениях pH, составляющих 4,0 и 4,4, в 10 mM натрий-ацетатном буфере, состоящем из 0,01% Pluronic F-68, 5% сорбита, с содержанием и без содержания 10% PG.

Таблица 24. Композиция состава 2C, забуференного при pH 4,0

Функция	Компонент	Количество на мл
Активный ингредиент	hu-Fc-слитый G-CSF	20 мг
Стабилизатор	Сорбит	50 мг
Поверхностно-активное вещество	Полоксамер 188 (Pluronic F68)	1 мг
Буферное средство	Тригидрат ацетата натрия	0,16 мг
Буферное средство	Уксусная кислота/гидроксид натрия	q.s.*

* В достаточном количестве

Таблица 25. Композиция состава 2D, забуференного при pH 4,4

Функция	Компонент	Количество на мл
Активный ингредиент	hu-Fc-слитый G-CSF	20 мг
Стабилизатор	Сорбит	50 мг
Поверхностно-активное вещество	Полоксамер 188 (Pluronic F68)	1 мг
Буферное средство	Тригидрат ацетата натрия	0,16 мг
Буферное средство	Уксусная кислота/гидроксид натрия	q.s.*

* В достаточном количестве

Таблица 26. Матрица исследования по оценке влияния значения pH и присутствия пропиленгликоля на стабильность 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF

Обозначение состава	pH	Обозначение состава + процентное содержание пропиленгликоля (PG)	Система упаковки
F2C	4,0	Только состав 2C	Шприц с кремнийорганическим покрытием
F2C+10PG	4,0	Состав 2C + 10% PG	
F2D	4,4	Только состав 2D	
F2D+10PG	4,4	Состав 2D + 10% PG	

Таблица 27. Процентное содержание мономеров для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью SEC-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью SEC-HPLC [%]			
	F2C	F2C+10PG	F2D	F2D+10PG
t=0	99,7	99,7	99,7	99,7
1 месяц	99,5	99,5	99,5	99,5
3 месяца	99,7	99,6	99,7	99,6
6 месяцев	99,6	99,6	99,6	99,6

Таблица 28. Процентное содержание гидрофобных молекул для 20 мг/мл hu-Fc-слитого CSF, установленное с помощью RP-HPLC при 2–8°C, (n=2)

2–8°C	Отн. площадь основного пика, определенная с помощью RP-HPLC [%]			
	F2C	F2C+10PG	F2D	F2D+10PG
t=0	97,3	96,7	97,5	96,8
1 месяц	96,3	96,4	96,5	96,5
3 месяца	95,9	95,9	95,9	96,0
6 месяцев	95,6	96,3	95,7	95,8

В варианте осуществления данного исследования обнаруживалось, что hu-Fc-слитый G-CSF являлся устойчивым в выбранных условиях, что было подтверждено с помощью анализов SEC-HPLC, RP-HPLC, SDS-PAGE и Gel-IEF (таблицы 27–28, фигуры 4–5). В ходе исследования не наблюдали ни агрегатов, ни расщепленных форм hu-Fc-слитого G-CSF. Таким образом, в настоящем изобретении обнаруживали, что составы как со значением pH, составляющим 4,0, так и со значением pH, составляющим 4,4, обеспечивали долгосрочную стабильность hu-Fc-слитого G-CSF в режиме реального времени, реальной температуры и в условиях ускоренных исследований стабильности.

Таблица 29. Композиция на основе раствора 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF

Функция	Компонент	Ссылка на стандарты	Количество на мл
Стабилизатор	Сорбит	Национальный формуляр	50 мг
Поверхностно-активное вещество	Полоксамер 188 (Pluronic F68)	Национальный формуляр	1 мг
Буферное средство	Тригидрат ацетата натрия	Фармакопея США	0,16 мг
Буферное средство	Уксусная кислота/гидроксид натрия	Фармакопея США	q.s.*

Органический растворитель	Пропиленгликоль	Фармакопея США	0,1 мл
---------------------------	-----------------	----------------	--------

* В достаточном количестве

В заключение, как применяется в данном документе, состав на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, как представлено в таблице 29, демонстрировал стабильность при значениях pH в диапазоне от 3,8 до 6,5, предпочтительно от 4,0 до 4,6. В данном документе состав согласно настоящему изобретению состоит из буферной системы, поверхностно-активного вещества, стабилизатора и/или PG в качестве органического растворителя.

Согласно настоящему изобретению буферная система может предусматривать тригидрат ацетата натрия и уксусную кислоту/гидроксид натрия.

Настоящее изобретение может предусматривать сорбит в качестве поверхностно-активного вещества, предпочтительно находящийся в концентрации от 0,08% вес/об. до 0,15% вес/об., и сорбит в качестве стабилизатора, предпочтительно находящийся в концентрации от 3,0% вес/об. до 7,0% вес/об. в пересчете на общий объем жидкого состава, при этом весовое соотношение сорбита и белка составляет от 3:2 до 7:2, предпочтительно 5:2.

Настоящее изобретение может предусматривать PG в концентрации 20% об./об. или меньше (Sigma, Швейцария), предпочтительно PG в концентрации 10% об./об. или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава, с целью уменьшения водного содержимого, которое способствует процессу расщепления G-CSF посредством гидролиза при кислотном pH.

Пояснение графических материалов

Фигура 1. Схематическое изображение белковой структуры hu-Fc-слитого G-CSF.

Фигура 2. Испытание на перетасовку дисульфидных связей. Образцы вариантов № F5 и № F6 (хранившиеся в течение 2 недель при 40°C) анализировали в восстановительных и невосстановительных условиях. Полоса 1: маркер, полоса 2: невосстановленный стандартный образец GX-G3, полоса 3: невосстановленный № F5, полоса 4: невосстановленный № F6, полоса 5: пустая, полоса 6: маркер, полоса 7:

восстановленный № F5, полоса 8: восстановленный № F6, полоса 9: восстановленный стандартный образец, полоса 10: маркер.

Фигура 3. Анализ SDS-PAGE после термической нагрузки при 40°C в течение 2 недель: полоса 1: стандартный образец, полоса 2: маркер, полосы 3–6: № F3, полосы 7–10: № F4.

Фигура 4. Анализ SDS-PAGE при 2–8°C при t=6 месяцев: полоса 1, 9: маркер, полоса 2, 5, 6: стандартный образец, полоса 3: № F2C, полоса 4: № F2C+10% PG, полоса 7: № F2D, полоса 8: № F2D+10% PG, полоса 10: пустая.

Фигура 5. Анализ Gel-IEF при 2–8°C при t=6 месяцев: полоса 1, 9: маркер, полоса 2, 5, 6: стандартный образец, полоса 3: № F2C, полоса 4: № F2C+10% PG, полоса 7: № F2D, полоса 8: № F2D+10% PG, полоса 10: пустая.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный состав на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, содержащий терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, где значение рН препарата составляет от 3,8 до 6,5.
2. Состав по п. 1, где значение рН препарата предпочтительно составляет от 4,0 до 4,6.
3. Состав по любому из предыдущих пунктов, где состав содержит по меньшей мере один стабилизатор, буферную систему и по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество.
4. Состав по п. 3, где буфер выбран из группы, состоящей из ацетатного, фосфатного, глицинатного, карбонатного, цитратного, гистидинового, трис-(гидроксиметил)-аминометанового (Трис) буферов или их комбинации.
5. Состав по п. 4, где буферная система содержит тригидрат ацетата натрия и уксусную кислоту/гидроксид натрия.
6. Состав по п. 3, где стабилизатор выбран из группы, состоящей из сорбита, маннита, инозитола, галактитола, дульцита, ксилита и арабита или их комбинации.
7. Состав по п. 6, где стабилизатор представляет собой сорбит.
8. Состав по п. 7, где сорбит содержится в концентрации от 3,0% вес/об. до 7,0% вес/об. в пересчете на общий объем состава.
9. Состав по п. 7, где весовое соотношение сорбита и белка составляет от 3:2 до 7:2.
10. Состав по п. 9, где весовое соотношение сорбита и белка предпочтительно составляет 5:2.
11. Состав по п. 3, где неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество на основе полисорбата или на основе полксамера, которое выбрано из группы, состоящей из полксамера 188, полисорбата 20 и полисорбата 80 или их комбинации.

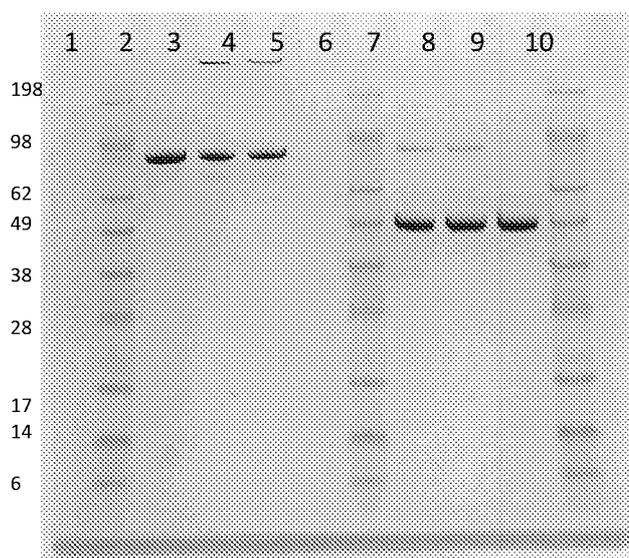
12. Состав по п. 11, где поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188.
13. Состав по п. 12, где полоксамер 188 содержится в концентрации от 0,08% вес/об. до 0,15% вес/об. в пересчете на общий объем жидкого состава.
14. Состав по п. 1, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, содержится в концентрации в диапазоне от 10 мг/мл до 80 мг/мл.
15. Состав по п. 14, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, предпочтительно содержится в концентрации в диапазоне от 20 мг/мл до 40 мг/мл.
16. Состав по любому из предыдущих пунктов, где состав содержит пропиленгликоль в качестве органического растворителя.
17. Состав по п. 16, где пропиленгликоль содержится в концентрации 20% об./об. или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава.
18. Состав по п. 17, где пропиленгликоль предпочтительно содержится в концентрации 10% об./об. или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава.
19. Стабильный состав на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, содержащий (i) терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, (ii) тригидрат ацетата натрия и уксусную кислоту/гидроксид натрия в качестве буферной системы, где значение pH препарата составляет от приблизительно 4,0 до 4,6.
20. Состав по п. 19, где состав дополнительно содержит сорбит в качестве стабилизатора и полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества.
21. Состав по любому из пп. 19–20, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, содержится в концентрации в диапазоне от 10 мг/мл до 80 мг/мл.
22. Состав по п. 21, где G-CSF, слитый с гибридным Fc, предпочтительно содержится в концентрации в диапазоне от 20 мг/мл до 40 мг/мл.
23. Состав по п. 20, где сорбит составляет от 3,0% вес/об. до 7,0% вес/об. в пересчете на общий объем состава.

24. Состав по п. 20, где весовое соотношение сорбита и белка составляет от 3:2 до 7:2.
25. Состав по п. 24, где весовое соотношение сорбита и белка предпочтительно составляет 5:2.
26. Состав по п. 20, где поверхностно-активное вещество содержится в концентрации в диапазоне от 0,08% вес/об. до 0,15% вес/об. в пересчете на общий объем жидкого состава.
27. Состав по любому из пп. 19–26, где состав содержит пропиленгликоль в качестве органического растворителя.
28. Состав по п. 27, где пропиленгликоль содержится в концентрации 20% об./об. или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава.
29. Состав по п. 28, где пропиленгликоль предпочтительно содержится в концентрации 10% об./об. или меньше в пересчете на общий объем жидкого состава.

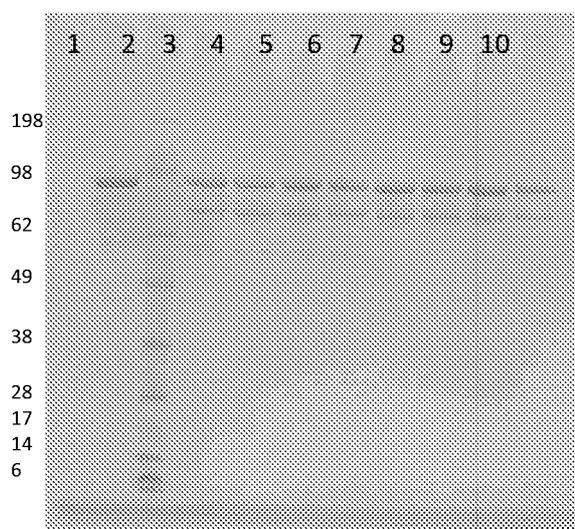
1/2



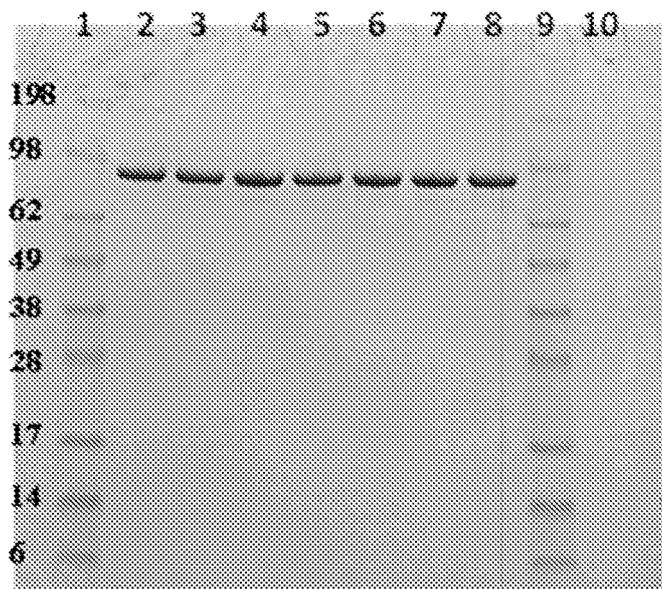
Фигура 1



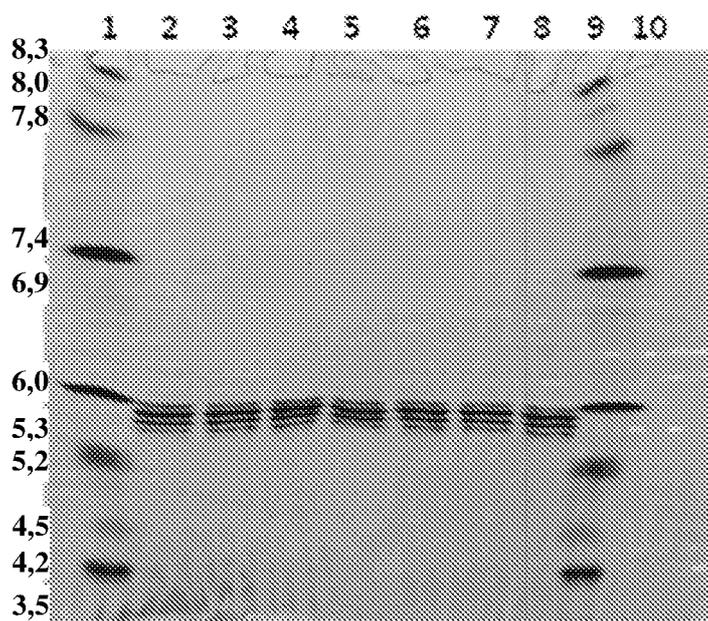
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5