(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041519 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.01

(21) Номер заявки
201891164

(22) Дата подачи заявки
2016.12.16

(51) Int. Cl. ***A61K 9/16*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МИКРОЧАСТИЦ (ВАРИАНТЫ)

(31) **62/268,259**
(32) **2015.12.16**
(33) **US**
(43) **2018.11.30**
(86) **PCT/US2016/067280**
(87) **WO 2017/106716 2017.06.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Брадники Филип, Чен Хантер (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2007298116
US-B1-6284282
US-A-6019968
AJMERA ANKLJR ET AL.: "Stabilisation of proteins via mixtures of amino acids during spray drying", INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 463, no. 1, 8 January 2014 (2014-01-08), pages 98-107, XP028605165, ISSN: 0378-5173, DOI: 10.1016/J.IJPHARM.2014.01.002, table 1
JAIN R. ET AL.: "CONTROLLED DRUG DELIVERY BY BIODEGRADABLE POLY(ESTER) DEVICES: DIFFERENT PREPARATIVE APPROACHES", DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, NEW YORK, NY, US, vol. 24, no. 8, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 703-727, XP009052301, ISSN: 0363-9045, DOI: 10.3109/03639049809082719, the whole document

(57) Изобретение относится к приготовленному фармацевтическому порошку, содержащему приблизительно 60-97% (мас./мас.) рецептор-Fc-слитого белка и приблизительно 3-40% (мас./мас.) термостабилизатора, выбранного из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций, при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок содержит от 3 до 6% воды, и указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергался вторичной сушке и где порошок имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм; а также к способу получения указанного фармацевтическогоу порошка.

041519 B1

041519 B1

Область техники

Данное изобретение относится к способам получения приготовленного фармацевтического порошка и приготовленным фармацевтическим порошкам (варианты), которые стабильны в течение длительного периода времени и которые сохраняют стабильность и биологическую активность при температуре окружающей среды и физиологических температурах в течение длительного периода времени.

Уровень техники

Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и рецептор-Fc-слитые белки, должны быть приготовлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы пригодными для введения пациентам, но и сохранить их стабильность при хранении и в месте введения. Например, терапевтические белки (например, антитела) в жидком растворе подвержены разложению, агрегации и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор будет приготовлен неправильно. При приготовлении терапевтической белковой композиции помимо стабильности также следует принимать во внимание другие аспекты. Примеры таких дополнительных аспектов включают вязкость раствора и концентрацию антитела, которые могут обеспечиваться данной композицией. При приготовлении терапевтического белка для замедленного высвобождения следует проявлять предельную осторожность, чтобы получить композицию, которая бы оставалась стабильной в течение длительного периода времени, а также при хранении и физиологической температуре, имела бы достаточную концентрацию антитела или другого терапевтического биологического вещества и обладала другими свойствами, которые обеспечивают возможность удобного введения данной композиции пациентам.

Жидкие композиции биологических молекул, как правило, предназначены для обеспечения возможности долгосрочной стабильности при замораживании или охлаждении, но зачастую не обеспечивают долгосрочной стабильности при комнатной температуре. Одним из решений, известных в данной области техники для сохранения стабильности и биологической/терапевтической активности биологической молекулы, является сублимационная сушка или же лиофилизация молекулы. Лиофилизация может обеспечивать сухой "осадок", который остается относительно стабильным при температуре окружающей среды в течение относительно длительного периода времени. Стабильность при комнатной температуре может быть особенно важна при хранении и реализации биотерапевтических средств по всему миру, особенно в тех местах, где электричество и холодильное оборудование являются ненадежными.

Еще одна проблема в области фармацевтических композиций заключается в необходимости увеличения концентраций терапевтического белка для облегчения доставки большого количества лекарственного средства в небольшом пространстве. Проблема максимизации количества белкового лекарственного средства на единицу объема усугубляется обратной необходимостью уменьшения количества вспомогательных веществ, которые помогают стабилизировать белок. По мере увеличения молярного соотношения белкового лекарственного средства к стабилизатору количество белка максимизируется с риском дестабилизации белка.

В публикации заявки на патент США № 2016/0176986 A1 описана высококонцентрированная (≥ 200 мг/мл) композиция IgG1 в неводном растворителе. Эта композиция содержит высушенные распылением частицы IgG1, суспендированные в неводном растворе, изготовленном с возможностью подкожной доставки. Высушенные распылением частицы содержат трегалозу в качестве стабилизатора и молекулу IgG1 в весовом соотношении, составляющем 1:2.

В публикации Shire et al. (J. Pharm. Sci., том 93, № 6, июнь 2004 г., 1390-1402) описано создание высококонцентрированных белковых композиций посредством лиофилизации. Shire описывает оптимальное молярное соотношение лиопротектора к белку как 300:1 или выше. Было описано, что композиция антитела с молярным соотношением лиопротектора к антителу, составляющим 500:1, имеет значительную стабильность при комнатной температуре, но обладает нежелательной гипертоничностью. То же самое антитело, приготовленное с более низким содержанием лиопротектора (при молярном соотношении лиопротектора к антителу, составляющем 250:1), продемонстрировало улучшенную и эффективную тоничность, но со значительно пониженной стабильностью. Компромиссная композиция с соотношением 250:1 требует хранения при 2-8°C для сохранения приемлемой стабильности.

В публикации Ajmera и Scherliesz (Int. J. Pharm., том 463, 2014, 98-107) описано использование аминокислот с высоким содержанием азота, аргинина и гистидина, для стабилизации каталазы во время распылительной сушки. Стабилизирующий эффект был обусловлен опосредованной азотом водородной связью. Весовое соотношение аминокислоты к каталазе для эффективной стабилизации составило 1:1 или 2:1.

Сущность изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к способу получения приготовленного фармацевтического порошка. В соответствии с этим аспектом распыляют водный раствор, содержащий термостабилизатор, выбранный из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций и антитело или рецептор-Fc-слитый белок при массовом соотношении 1:5-2:5. Затем распыленный водный раствор нагревают с выпариванием воды из аэрозольных капель и получением приготовленного фармацевтического порошка, где тепло применяется к распыленному водному раствору для испарения воды из порошка, так чтобы полученный в результате приготовленный фармацевтический порошок имел влажность на

уровне равном 3-6%,

при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергают вторичной сушке и, где порошок имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм. В одном варианте реализации изобретения отдельные частицы, содержащие белковый порошок, впоследствии покрывают биоразлагаемым полимером.

В одном аспекте данное изобретение относится к способу получения приготовленного фармацевтического порошка. В соответствии с этим аспектом распыляют водный раствор, содержащий термостабилизатор, выбранный из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций, и антитело или рецептор-Fc-слитый белок в молярным соотношением, составляющим менее 300:1. Затем распыленный водный раствор нагревают с выпариванием воды из аэрозольных капель и получением приготовленного фармацевтического порошка. В одном варианте реализации изобретения отдельные частицы, содержащие приготовленный фармацевтический порошок, впоследствии покрывают биоразлагаемым полимером.

В одном аспекте данное изобретение относится к способу получения приготовленного фармацевтического порошка. В соответствии с этим аспектом распыляют водный раствор, содержащий i) термостабилизатор и от 50 до 180 мг/мл белка-ловушки VEGF с массовым соотношением 1:5-2:5, где термостабилизатор выбран из сахарозы, трегалозы, маннита, изолейцина, пролина, или их комбинации; и ii) 0,03-0,1% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитанмонолаурата. Затем распыленный водный раствор нагревают с выпариванием воды из аэрозольных капель и получением приготовленного фармацевтического порошка. В одном варианте реализации изобретения отдельные частицы, содержащие белковый порошок, впоследствии покрывают биоразлагаемым полимером.

В одном аспекте данное изобретение относится к приготовленному фармацевтическому порошку (варианты), полученному в соответствии с одним их указанных выше способов, содержащему около 60-97% (мас./мас.) рецептор-Fc-слитого белка и около 3-40% (мас./мас.) термостабилизатора, выбранного из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций. В соответствии с этим аспектом приготовленный фармацевтический порошок не является абсолютно сухим. Указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергается вторичной сушке и имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм. В одном варианте реализации изобретения отдельные белковые частицы порошка имеют покрытие из биоразлагаемого полимера.

Фигуры

На фиг. 1 изображен линейный график, иллюстрирующий распределение частиц по размерам в эквивалентном круговом диаметре (ECD) по объему высушенных распылением частиц, взвешенных в этаноле, при измерении посредством визуализации микропотока (MFI). Частицы высушивали распылением при различных температурах на входе: 100°C (штрихпунктирная линия); 110°C (штриховая линия); 120°C (пунктирная линия); и 130°C (сплошная линия).

На фиг. 2 изображен линейный график, иллюстрирующий распределение по размерам в эквивалентном круговом диаметре (ECD) по объему высушенных распылением частиц, взвешенных в этаноле, при измерении посредством визуализации микропотока (MFI). Предварительно подвергнутая распылительной сушке композиция содержала 0% (штрихпунктирная линия), 0,03% (штриховая линия) и 0,1% (сплошная линия) мас./об. полисорбата 20 (PS20).

На фиг. 3 изображена гистограмма, иллюстрирующая количественное распределение высушенных распылением частиц, взвешенных в этаноле, по соотношению сторон, при измерении посредством визуализации микропотока (MFI). Соотношение сторон, равное 1, представляет собой сферическую морфологию частиц. Предварительно подвергнутая распылительной сушке композиция содержала 0% (столбцы гистограммы с пунктирной заливкой), 0,03% (столбцы гистограммы с заливкой диагональной штриховкой) и 0,1% (столбцы гистограммы со сплошной заливкой) мас./об. полисорбата 20 (PS20).

На фиг. 4 изображен линейный график, иллюстрирующий распределение по размерам в эквивалентном круговом диаметре (ECD) по объему высушенных распылением частиц, взвешенных в этаноле, при измерении посредством визуализации микропотока (MFI). В способе с низким содержанием растворенного вещества (изображенном штриховой линией) использовали примерно в 10 раз более низкую концентрацию растворенного вещества, чем в стандартном способе (изображенном сплошной линией).

На фиг. 5 изображен линейный график, иллюстрирующий распределение по размерам в эквивалентном круговом диаметре (ECD) по объему высушенных распылением частиц (белковые микрочастицы без полимерного покрытия; штриховая линия) и частиц с нанесенным распылением покрытием (белковые микрочастицы с полимерным покрытием, сплошная линия), при измерении посредством визуализации микропотока (MFI).

На фиг. 6, блоках A и B, изображены точечные графики, иллюстрирующие скорость образования высокомолекулярных (HMW) частиц как функцию квадратного корня времени при 50°C, при измерении с помощью SEC-UPLC. Скорости рассчитывают, исходя из их весового соотношения (6A) и молярных соотношений (6B) термостабилизатора к белку. Композиции, обозначенные квадратами со сплошной заливкой, содержат только сахарозу. Композиции, содержащие другие термостабилизаторы, изображены незакрашенными кружками.

Подробное описание изобретения

Хотя на практике или при тестировании данного изобретения могут применяться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, далее в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы.

В биофармацевтической промышленности складывается проблема в обеспечении стабильных белковых композиций при достаточно высоких концентрациях с обеспечением эффективной дозы в небольшом объеме. Для поддержания стабильности белка в состав композиции включают различные стабилизаторы и другие вспомогательные вещества. Это обеспечивает компромисс между стабильностью белка и концентрацией белка. Данное изобретение относится к улучшенной композиции, содержащей белок, который остается стабильным при высокой плотности. Количество стабильного белка, предоставляемого на единицу объема, увеличивается без ущерба для стабильности белка.

В одном аспекте данное изобретение относится к приготовленному фармацевтическому порошку, содержащему около 60-97% (мас./мас.) гликопротеина и около 3-40% (мас./мас.) термостабилизатора. В другом аспекте данное изобретение относится к приготовленному фармацевтическому порошку, содержащему около 85-97% (мас./мас.) гликопротеина без термостабилизатора. В одном варианте реализации этого аспекта остаточная вода, которая остается в порошке, стабилизирует белок.

В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит 60-70% (мас./мас.) гликопротеина, 60-70% (мас./мас.) гликопротеина, 65-75% (мас./мас.) гликопротеина, 70-80% (мас./мас.) гликопротеина, 75-85% (мас./мас.) гликопротеина, 80-90% (мас./мас.) гликопротеина, 85-95% (мас./мас.) гликопротеина, около 60% (мас./мас.) гликопротеина, около 62% (мас./мас.) гликопротеина, около 64% (мас./мас.) гликопротеина, около 66% (мас./мас.) гликопротеина, около 68% (мас./мас.) гликопротеина, около 70% (мас./мас.) гликопротеина, около 72% (мас./мас.) гликопротеина, около 74% (мас./мас.) гликопротеина, около 76% (мас./мас.) гликопротеина, около 78% (мас./мас.) гликопротеина, около 80% (мас./мас.) гликопротеина, около 82% (мас./мас.) гликопротеина, около 84% (мас./мас.) гликопротеина, около 86% (мас./мас.) гликопротеина, около 88% (мас./мас.) гликопротеина, около 90% (мас./мас.) гликопротеина, около 92% (мас./мас.) гликопротеина, около 94% (мас./мас.) гликопротеина, около 96% (мас./мас.) гликопротеина или около 98% (мас./мас.) гликопротеина.

В некоторых вариантах реализации приготовленный фармацевтический порошок содержит 3-6% (мас./мас.) термостабилизатора, 5-7% (мас./мас.) термостабилизатора, 6-8% (мас./мас.) термостабилизатора, 7-9% (мас./мас.) термостабилизатора, 8-10% (мас./мас.) термостабилизатора, 9-11% (мас./мас.) термостабилизатора, 10-12% (мас./мас.) термостабилизатора, 11-13% (мас./мас.) термостабилизатора, 12-14% (мас./мас.) термостабилизатора, 13-15% (мас./мас.) термостабилизатора, 14-16% (мас./мас.) термостабилизатора, 15-17% (мас./мас.) термостабилизатора, 16-18% (мас./мас.) термостабилизатора, 17-19% (мас./мас.) термостабилизатора, 18-20% (мас./мас.) термостабилизатора, 19-21% (мас./мас.) термостабилизатора, 20-22% (мас./мас.) термостабилизатора, 21-23% (мас./мас.) термостабилизатора, 22-24% (мас./мас.) термостабилизатора, 23-25% (мас./мас.) термостабилизатора, 24-26% (мас./мас.) термостабилизатора, 25-27% (мас./мас.) термостабилизатора, 22-24% (мас./мас.) термостабилизатора, 23-25% (мас./мас.) термостабилизатора, 24-26% (мас./мас.) термостабилизатора, 25-27% (мас./мас.) термостабилизатора, 22-24% (мас./мас.) термостабилизатора, 23-25% (мас./мас.) термостабилизатора, 24-26% (мас./мас.) термостабилизатора, 25-27% (мас./мас.) термостабилизатора, 26-28% (мас./мас.) термостабилизатора, 27-29% (мас./мас.) термостабилизатора, 28-30% (мас./мас.) термостабилизатора, 29-31% (мас./мас.) термостабилизатора, 30-32% (мас./мас.) термостабилизатора, 31-33% (мас./мас.) термостабилизатора, 32-34% (мас./мас.) термостабилизатора, 33-35% (мас./мас.) термостабилизатора, 34-36% (мас./мас.) термостабилизатора, 35-37% (мас./мас.) термостабилизатора, 36-38% (мас./мас.) термостабилизатора, 37-39% (мас./мас.) термостабилизатора, 38-40% (мас./мас.) термостабилизатора или 39-41% (мас./мас.) термостабилизатора.

В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок согласно данному изобретению содержит множество белковых частиц микронного размера. Входящие в состав порошка белковые частицы микронного размера могут называться в данном документе "микронизированными белок-содержащими частицами", "белковыми частицами", "белковыми микрочастицами", "микрочастицами", "множеством микронизированных белок-содержащих частиц", "множеством белковых частиц", "множеством белковых микрочастиц", "множеством микрочастиц", "входящими в состав порошка белковыми микрочастицами" или "входящими в состав белковыми микрочастицами".

В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный приготовленный порошок является сыпучим в обычных условиях хранения и во время операций по наполнению фармацевтическими препаратами. В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный порошок имеет отношение Хаусснера (т.е. отношение насыпной плотности порошка к объемной плотности порошка) в условиях операций по наполнению или условиях хранения, составляющее <1,5, <1,45, <1,4, <1,35, <1,3, <1,25, <1,2, <1,15 или <1,1.

В некоторых вариантах реализации изобретения предпочтительным способом определения сыпуче-

сти порошка является тест на прилипание к стенкам флакона. Флакон из прозрачного стекла частично наполняют приготовленным фармацевтическим порошком, затем флакон вращают по его вертикальной оси. Порошок, который способен свободно осыпаться при вращении флакона, является сыпучим. Порошок, который имеет некоторую степень статического заряда, являющегося причиной его прилипания к стенкам флакона, или требует легкого постукивания или удаления статического заряда, чтобы заставить его осыпаться при вращении флакона, в некоторых вариантах реализации считается сыпучим. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок является сыпучим, если <30%, <25%, <20%, <15%, <10% или <5% внутренней поверхности флакона покрывается порошком после вращения флакона. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок является сыпучим, если входящие в его состав частицы, которые прилипают к стенкам флакона после вращения, удаляются со стенок флакона при постукивании флаконом по твердой поверхности или пальцем по флакону 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз или 10 раз. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок является сыпучим, если входящие в его состав частицы, которые прилипают к стенкам флакона после вращения, удаляются со стенок флакона при постукивании флаконом с совокупной силой, составляющей ≤25 микроньютонов (мкН), около 25 мкН, около 20 мкН, около 15 мкН, около 10 мкН, около 9 мкН, около 8 мкН, около 7 мкН, около 6 мкН, около 5 мкН, около 4 мкН, около 3 мкН, около 2 мкН, около 1 мкН или <1 мкН. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок, в котором подавляющее большинство входящих в состав частиц прилипает к стенкам флаконов под воздействием статических сил и не осыпается, не является сыпучим. В некоторых вариантах реализации изобретения предпочтительный эталонный порошок, который представляет собой сыпучий порошок, состоит из 50-150 мкм стеклянных шариков (стандарт Malvern QA, часть № CRM0016, производства Whitehouse Scientific, Честер, Великобритания).

В некоторых вариантах реализации изобретения сыпучесть порошка измеряют углом естественного откоса, прессуемостью (например, отношением Хауснера), сыпучестью во вращающемся барабане, проходящим через отверстие объемом, анализом сдвиговых ячеек, реометрией или скоростью фасовки. В некоторых вариантах реализации изобретения сыпучесть измеряют с помощью анализатора порошков REVOLUTION (Mercury Scientific Inc., Ньютаун, штат Коннектикут), анализатора порошков EVOLUTION (Mercury), анализатора сыпучести порошков VOLUTION (Mercury) или анализатора сыпучести FT 300 (Sotax AG, Эш, Швейцария). Публикация Rao et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, том 74, выпуск 2, февраль 2010 г., сс. 388-396 включена в данный документ для предоставления информации об определении степени сыпучести посредством барабанного вращения и лавинообразования.

В некоторых вариантах реализации изобретения сыпучесть определяется проходящим через отверстие объемом. В некоторых вариантах реализации изобретения, где количество порошка является предельным (например, 1-2 г или менее), прохождение через отверстие осуществляется путем итеративного разрушения сводчатых структур с последующим прохождением порошка через отверстие (например, 3 мм) и измерением массы порошка, который проходит через отверстие, в зависимости от времени. Степень сыпучести предоставляется в миллиграммах в секунду. В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок является сыпучим, если скорость прохождения через 3 мм отверстие составляет ≥ 10 мг/с, ≥ 15 мг/с, ≥ 20 мг/с, ≥ 25 мг/с, 30 ≥ мг/с, ≥ 35 мг/с, ≥ 40 мг/с, ≥ 45 мг/с, ≥ 50 мг/с, ≥ 55 мг/с, ≥ 60 мг/с, ≥ 65 мг/с, ≥ 70 мг/с, ≥ 75 мг/с, ≥ 80 мг/с, ≥ 85 мг/с, ≥ 90 мг/с, ≥ 95 мг/с или ≥ 100 мг/с. Публикация Seppälä et al., AAPS PharmSciTech, т. 11, № 1, март 2010 г., сс. 402-408 включена в данный документ для предоставления информации о параметрах сыпучести смеси лекарственного средства, содержащего вспомогательное вещество, исходя из скорости прохождения через отверстие.

Составляющая белковая микрочастица приготовленного фармацевтического порошка может быть примерно сферической формы. Некоторые белковые микрочастицы имеют форму, приближенную к сферической, в то время как другие белковые микрочастицы имеют более неправильную форму. Форма белковых микрочастиц может быть определена, в частности, посредством статического рассеяния света (DLS), визуализации микропотока (MFI) или лазерной дифракции. В основе DLS лежит измерение интенсивности рассеянного света в нескольких разных углах, возникающих в результате интенсивного света, направленного на суспензию частиц. Затем к данным рассеяния применяют уравнение Фраунгофера для определения размера и формы белковых микрочастиц. Патент США 5104221 A включен в данный документ посредством ссылки для предоставления информации о применении уравнения Фраунгофера для определения размера и формы частиц микронного размера. DLS, как правило, применяют к объектам размером 1 мкм или меньше. MFI основана на серии светлопольных изображений частиц, полученных из потока образца, проходящего через проточную кювету. Данные изображения анализируют с определением размера частицы и круглости или соотношения сторон. Круглость относится к тому, насколько круглой или сферической является белковая микрочастица, и выражается по шкале 0-1, где 1 означает абсолютную сферичность. Термин "соотношение сторон", который, как правило, означает длину по ширине объекта, используется взаимозаменяемо с термином "круглость". Соотношение сторон может быть выражено как отношение длины малой оси к длине большой оси. Таким образом, более сферическая части-

ца имеет "соотношение сторон", приближенное к 1 (например, 0,98).

Лазерная дифракция представляет собой еще один метод, основанный на дифракции Фраунгофера, используемый для определения формы и размера частиц в диапазоне 1-100 мкм. Луч лазера проходит через суспензию частиц, а промежуточная линза фокусирует дифрагированный свет на датчик. Публикация De Boer et al., Int. J. Pharmaceutics, 249 (1-2): 219-231 (2002) включена в данный документ для предоставления информации о размере частиц посредством лазерной дифракции. В одном варианте реализации изобретения распределение входящих в состав порошка белковых микрочастиц по размерам определяют посредством лазерной дифракции с применением лазерного анализатора размера частиц MASTERSIZER 3000 от Malvern (Malvern, Великобритания).

В некоторых вариантах реализации изобретения форма белковой микрочастицы является почти сферической. В одном варианте реализации изобретения соотношение сторон белковой микрочастицы составляет ≥ 0,80. В другом варианте реализации изобретения соотношение сторон белковой микрочастицы составляет от около 0,90 до около 0,98. Форма белковой микрочастицы может быть определена, в частности, посредством визуализации микропотока (MFI).

В контексте данного документа термин "диаметр" порошкообразной микрочастицы включает значение любого из следующего: (a) диаметр сферы, которая описывает микрочастицу, (b) диаметр самой большой сферы, которая вписывается в границы микрочастицы или белковой сердцевины, (c) любой замер между описанной сферой (a) и вписанной сферой (b), включая среднее значение между ними, (d) длина самой длинной оси микрочастицы, (e) длина самой короткой оси микрочастицы, (f) любой замер между длиной длинной оси (d) и длиной короткой оси (e), в том числе среднее значение между ними двумя и/или (g) эквивалентный круговой диаметр ("ECD"), при определении посредством MFI, исследований частиц методом светоблокировки, таких как DLS или т.п. MFI и DLS в целом описаны в публикациях Sharma et al., "Micro-flow imaging: flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations," 12(3) AAPS J. 455-64 (2010); и B. J. Frisken, "Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data," 40(24) Applied Optics 4087-91 (2001), которые включены в данный документ для предоставления информации о визуализации микропотока и динамическом рассеянии света. Диаметр обычно выражается в микрометрах (мкм или микрон).

Белковая микрочастица заявленного приготовленного фармацевтического порошка может быть почти сферической формы и иметь диаметр в диапазоне от 2 до около 45 мкм. В одном варианте реализации изобретения большинство белковых микрочастиц порошка имеют диаметр, составляющий менее 10 мкм, при определении посредством MFI. В некоторых вариантах реализации изобретения диапазон размеров белковых микрочастиц заявленного приготовленного фармацевтического порошка составляет 1-10 мкм, 2-10 мкм, 3-10 мкм, 4-10 мкм, 5-10 мкм, 6-10 мкм, 7-10 мкм, 8-10 мкм, 9-10 мкм, 1-9 мкм, 1-8 мкм, 1-7 мкм, 1-6 мкм, 1-5 мкм, 1-4 мкм, 1-3 мкм, 1-2 мкм, 2-9 мкм, 2-8 мкм, 2-7 мкм, 2-6 мкм, около 1 мкм, около 1,5 мкм, около 2 мкм, около 2,5 мкм, около 3 мкм, около 3,5 мкм, около 4 мкм, около 4,5 мкм, около 5 мкм, около 5,5 мкм, около 6 мкм, около 6,5 мкм, около 7 мкм, около 7,5 мкм, около 8 мкм, около 8,5 мкм, около 9 мкм, около 9,5 или около 10 мкм.

В некоторых вариантах реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет < 50 мкм. В одном варианте реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет < 12 мкм. В другом варианте реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет < 10 мкм. В еще одном варианте реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет от около 0,5 мкм до около 7,0 мкм. В одном конкретном варианте реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет около 5,0 мкм. В другом конкретном варианте реализации изобретения диаметр белковой микрочастицы составляет около 2,5 мкм. Диаметр белковых микрочастиц может быть определен, в частности, посредством MFI или статического рассеяния света.

Диаметр белковой микрочастицы положительно коррелирует с объемом белковой микрочастицы. Например, идеальная сфера размером 10 мкм составляет около 5×10^{-4} нл, а идеальная сфера размером 5 мкм составляет около 7×10^{-5} нл. В некоторых вариантах реализации изобретения диапазон объемов белковых микрочастиц заявленного приготовленного фармацевтического порошка составляет 5×10^{-7}-5×10^{-4} нл, 10^{-6}-5×10^{-4} нл, 5×10^{-6}-5×10^{-4} нл, 10^{-5}-5×10^{-4} нл, 5×10^{-5}-5×10^{-4} нл, 10^{-4}-5×10^{-4} нл, около 5×10^{-7} нл, около 6×10^{-7} нл, около 7×10^{-7} нл, около 8×10^{-7} нл, около 9×10^{-7} нл, около 10^{-6} нл, около 2×10^{-6} нл или около 3×10^{-6} нл, около 4×10^{-6} нл, около 5×10^{-6} нл или около 6×10^{-6} нл, около 7×10^{-6} нл, около 8×10^{-6} нл или около 9×10^{-6} нл, около 10^{-5} нл, около 2×10^{-5} нл или около 3×10^{-5} нл, около 4×10^{-5} нл, около 5×10^{-5} нл или около 6×10^{-5} нл, около 7×10^{-5} нл, около 8×10^{-5} нл или около 9×10^{-5} нл, около 10^{-4} нл, около 2×10^{-4} нл или около 3×10^{-4} нл, около 4×10^{-4} нл, около 5×10^{-4} нл или около 6×10^{-4} нл, около 7×10^{-4} нл, около 8×10^{-4} нл или около 9×10^{-4} нл или 10^{-3} нл.

В одном варианте реализации изобретения предлагаемый приготовленный фармацевтический порошок является "абсолютно сухим". Порошок, который является абсолютно сухим, может содержать до 3% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения абсолютно сухой порошок содержит ≤ 3% (мас./мас.) воды, ≤ 2,9% (мас./мас.) воды, ≤ 2,8% (мас./мас.) воды, ≤ 2,7% (мас./мас.) воды, ≤ 2,6% (мас./мас.) воды, ≤ 2,5% (мас./мас.) воды, ≤ 2,4% (мас./мас.) воды, ≤ 2,3% (мас./мас.) воды, ≤ 2,2%

(мас./мас.) воды, ≤ 2,1% (мас./мас.) воды, ≤ 2,0% (мас./мас.) воды, ≤ 1,9% (мас./мас.) воды, ≤ 1,8% (мас./мас.) воды, ≤ 1,7% (мас./мас.) воды, ≤ 1,6% (мас./мас.) воды, ≤ 1,5% (мас./мас.) воды, ≤ 1,4% (мас./мас.) воды, ≤ 1,3% (мас./мас.) воды, ≤ 1,2% (мас./мас.) воды, ≤ 1,1% (мас./мас.) воды, ≤ 1,0% (мас./мас.) воды, ≤ 0,9% (мас./мас.) воды, ≤ 0,8% (мас./мас.) воды, ≤ 0,7% (мас./мас.) воды, ≤ 0,6% (мас./мас.) воды, ≤ 0,5% (мас./мас.) воды, ≤ 0,4% (мас./мас.) воды, ≤ 0,3% (мас./мас.) воды, ≤ 0,2% (мас./мас.) воды или ≤ 0,1% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения абсолютно сухой порошок содержит около 3% (мас./мас.) воды, около 2,5% (мас./мас.) воды, около 2% (мас./мас.) воды, около 1,5% (мас./мас.) воды, около 1% (мас./мас.) воды, около 0,5% (мас./мас.) воды или около 0% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения абсолютно сухой порошок содержит 0-3% (мас./мас.) воды, 0,05-3% (мас./мас.) воды, 0,5-3% (мас./мас.) воды, 1-3% (мас./мас.) воды, 2-3% (мас./мас.) воды, 0-2% (мас./мас.) воды, 0,05-2% (мас./мас.) воды, 0,5-2% (мас./мас.) воды, 1-2% (мас./мас.) воды, 0-1% (мас./мас.) воды, 0,05-1% (мас./мас.) воды или 0,5-1% (мас./мас.) воды.

В другом варианте реализации изобретения предлагаемый приготовленный фармацевтический порошок не является абсолютно сухим. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемый приготовленный фармацевтический порошок, который не является абсолютно сухим, содержит не более 10% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемый приготовленный фармацевтический порошок, который не является абсолютно сухим, содержит более 3% (мас./мас.) воды и не более 10% (мас./мас.) воды, 3,5-10% (мас./мас.) воды, 4-10% (мас./мас.) воды, 4,5-10% (мас./мас.) воды, 5-10% (мас./мас.) воды, 5,5-10% (мас./мас.) воды, 6-10% (мас./мас.) воды, 6,5-10% (мас./мас.) воды, 7-10% (мас./мас.) воды, 7,5-10% (мас./мас.) воды, 8-10% (мас./мас.) воды, 8,5-10% (мас./мас.) воды, 9-10% (мас./мас.) воды, 9,5-10% (мас./мас.) воды, >3-9% (мас./мас.) воды, >3-9% (мас./мас.) воды, >3-8,5% (мас./мас.) воды, >3-8% (мас./мас.) воды, >3-7,5% (мас./мас.) воды, >3-7% (мас./мас.) воды, >3-6,5% (мас./мас.) воды, >3-6% (мас./мас.) воды, >3-5,5% (мас./мас.) воды, >3-5% (мас./мас.) воды, >3-4,5% (мас./мас.) воды, >3-4% (мас./мас.) воды, >3-3,5% (мас./мас.) воды, около 3,1% (мас./мас.) воды, около 3,5% (мас./мас.) воды, около 4% (мас./мас.) воды, около 4,5% (мас./мас.) воды, около 5% (мас./мас.) воды, около 5,5% (мас./мас.) воды, около 6% (мас./мас.) воды, около 6,5% (мас./мас.) воды, около 7% (мас./мас.) воды, около 7,5% (мас./мас.) воды, около 8% (мас./мас.) воды, около 8,5% (мас./мас.) воды, около 9% (мас./мас.) воды, около 9,5% (мас./мас.) воды или около 10% (мас./мас.) воды.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаемый приготовленный фармацевтический порошок может содержать до 10% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок содержит ≤ 10% (мас./мас.) воды, ≤ 9,5% (мас./мас.) воды, ≤ 9% (мас./мас.) воды, ≤ 8,5% (мас./мас.) воды, ≤ 8% (мас./мас.) воды, ≤ 7,5% (мас./мас.) воды, ≤ 7% (мас./мас.) воды, ≤ 6,5% (мас./мас.) воды, ≤ 6% (мас./мас.) воды, ≤ 5,5% (мас./мас.) воды, ≤ 5% (мас./мас.) воды, ≤ 4,5% (мас./мас.) воды, ≤ 4% (мас./мас.) воды, ≤ 3,5% (мас./мас.) воды, ≤ 3% (мас./мас.) воды, ≤ 2,5% (мас./мас.) воды, ≤ 2% (мас./мас.) воды, ≤ 1,5% (мас./мас.) воды, ≤ 1% (мас./мас.) воды или ≤ 0,5% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок содержит около 10% (мас./мас.) воды, около 9,5% (мас./мас.) воды, около 9% (мас./мас.) воды, около 8,5% (мас./мас.) воды, около 8% (мас./мас.) воды, около 7,5% (мас./мас.) воды, около 7% (мас./мас.) воды, около 6,5% (мас./мас.) воды, около 6% (мас./мас.) воды, около 5,5% (мас./мас.) воды, около 5% (мас./мас.) воды, около 4,5% (мас./мас.) воды, около 4% (мас./мас.) воды, около 3,5% (мас./мас.) воды, около 3% (мас./мас.) воды, около 2,5% (мас./мас.) воды, около 2% (мас./мас.) воды, около 1,5% (мас./мас.) воды, около 1% (мас./мас.) воды, около 0,5% (мас./мас.) воды или около 0% (мас./мас.) воды. В некоторых вариантах реализации изобретения порошок содержит 0,01-10% (мас./мас.) воды, 0,01-3% (мас./мас.) воды, 0,5-4% (мас./мас.) воды, 3-10% (мас./мас.) воды, 0-3% (мас./мас.) воды, 0,5-3,5% (мас./мас.) воды, 1-4% (мас./мас.) воды, 1,5-4,5% (мас./мас.) воды, 2-5% (мас./мас.) воды, 2,5-5,5% (мас./мас.) воды, 3-6% (мас./мас.) воды, 3,5-6,5% (мас./мас.) воды, 4-7% (мас./мас.) воды, 4,5-7,5% (мас./мас.) воды, 5-8% (мас./мас.) воды, 5,5-8,5% (мас./мас.) воды, 6-9% (мас./мас.) воды, 6,5-9,5% (мас./мас.) воды или 7-10% (мас./мас.) воды.

Содержание воды в микрочастицах может быть определено с помощью любого одного или более методов, известных в данной области техники. Эти методы включают гравиметрические методы, в том числе термогравиметрию, газовую хроматографию, спектроскопию в ближней инфракрасной области, кулонометрию и метод Карла Фишера. Эти методы рассмотрены в публикации J. K. Townes, "Moisture content in proteins: its effects and measurement," 705 J. Chromatography A 115-127, 1995, и ссылках, указанных в ней. Например, можно использовать метод (гравиметрический) потери в массе при высушивании (LOD), в котором микрочастицы взвешивают, подвергают нагреванию с отгонкой воды и других летучих веществ, а затем снова взвешивают. Потеря в массе объясняется водой (и другими летучими веществами), содержащимися в исходном материале. Спектроскопия в ближней инфракрасной области измеряет отражение волн в диапазоне от 1100 до 2500 нм через стеклянный флакон (стеклянную поверхность), содержащий белок, с определением содержания влаги без разрушения образца. См. публикации United States Pharmacopeia, XXIII Revision, USP Convention, Rockville, MD 1995, pp. 1801-1802; и Savage et. al., "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy," 26 Biologicals 119-124, 1998. Предпочтительным

методом определения содержания воды является метод Карла Фишера (объемный или кулонометрический), который определяет количество H_2O посредством измерения окисления SO_2 с помощью I_2, где на моль H_2O потребляется один моль I_2.

Вода может стабилизировать или иным образом способствовать стабильности белка заявленного приготовленного фармацевтического порошка, и в некоторых вариантах реализации изобретения заменять термостабилизатор.

В одном варианте реализации изобретения гликопротеин, содержащийся в приготовленном фармацевтическом порошке, является стабильным. Термин "стабильный" или "стабильность" относится к сохранению приемлемой степени физической и химической структуры или биологической функции гликопротеина после хранения в определенных условиях или после введения в физиологически значимую среду. Белок может быть стабильным, даже если он не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения или введения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах сохранение около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98 или около 99% структуры или функции белка после хранения или введения в течение определенного периода времени может считаться "стабильным".

Стабильность может быть измерена, в частности, посредством определения процента нативной молекулы, которая остается в композиции после хранения или введения пациенту в течение определенного периода времени при определенной температуре. Процент белка, который сохраняет свою естественную конформацию, может быть определен, в частности, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-HPLC]). Чтобы определить стабильность белка, в одном варианте реализации изобретения заявленный приготовленный фармацевтический порошок солюбилизируют, а затем подвергают белок тестированию. Нативный белок включает белок, который является неагрегированным и недеградированным. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% нативной формы белка могут быть детектированы в предлагаемом приготовленном фармацевтическом порошке после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре или в физиологических условиях после введения в организм пациента (например, имплантации).

Агрегированный белок может быть детектирован как частицы, перенесенные в виде высокомолекулярных частиц на гель или хроматографическое сито. Термин "высокомолекулярная" или "HMW" частица или белок могут использоваться взаимозаменяемо с термином "агрегат", "агрегаты" или "агрегированный белок". Стабильный белок заявленного приготовленного фармацевтического порошка подвергается увеличению скорости образования HMW частиц (также называемой скоростью агрегации), составляющей < 10% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 9% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 8% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 7% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 6% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 5% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 4% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 3% в месяц$^{\wedge 1/2}$, < 2% в месяц$^{\wedge 1/2}$ или < 1% в месяц$^{\wedge 1/2}$. В предпочтительном варианте реализации изобретения скорость агрегации белка, содержащегося в приготовленном фармацевтическом порошке, составляет < 5% в месяц$^{\wedge 1/2}$.

Определенное количество времени, после которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца и более. Температура, при которой микрочастицы могут находиться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80 до около 50°C, например, храниться при около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C или других окружающих температурах, около 35°C, около 37°C или других физиологических температурах, около 45 или около 50°C.

Стабильность может быть измерена посредством определения процента белка, который образует агрегат (т.е. высокомолекулярные частицы) после определенного количества времени при определенной температуре, при этом стабильность является обратно пропорциональной проценту высокомолекулярных (HMW) частиц, которые образуются. Процент HMW частиц белка может быть определен с помощью эксклюзионной хроматографии после солюбилизации, как описано выше. Белковая микрочастица также может считаться стабильной, если через три месяца при температуре окружающей среды в HMW форме детектируется менее около 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% белка. Предпочтительно < 10%, < 5% или < 2% белка, содержащегося в приготовленном фармацевтическом порошке, присутствует в виде HMW частиц.

Стабильность может быть измерена посредством определения процента белка, который разлагается или иным образом обнаруживается в виде низкомолекулярных (LMW) частиц в микрочастице через определенное количество времени при определенной температуре, при этом стабильность является обратно пропорциональной проценту LMW частиц, который детектируется в солюбилизированной микрочастице. Процент LMW частиц белка может быть определен с помощью эксклюзионной хроматографии, как

описано выше. Белковая микрочастица также может считаться стабильной, если через три месяца при температуре окружающей среды в LMW форме детектируется менее около 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 или 0,1% белка.

В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный приготовленный фармацевтический порошок содержит буфер. Буферы хорошо известны в данной области техники. В общем, буфер включен в исходный материал водного белкового раствора, применяемый для получения заявленного порошка. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер включен в исходный материал в концентрации, составляющей от 1 мМ до 100 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения буфер включен в исходный материал в концентрации, составляющей около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буфер присутствует в исходном материале в концентрации, составляющей от 5 мМ ± 0,75 мМ до 15 мМ ± 2,25 мМ; от 6 мМ ± 0,9 мМ до 14 мМ ± 2,1 мМ; от 7 мМ ± 1,05 мМ до 13 мМ ± 1,95 мМ; от 8 мМ ± 1,2 мМ до 12 мМ ± 1,8 мМ; от 9 мМ ± 1,35 мМ до 11 мМ ± 1,65 мМ; 10 мМ ± 1,5 мМ; или около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения буферная система исходного материала содержит гистидин, фосфат и/или ацетат в концентрации, составляющей 10 мМ ± 1,5 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер присутствует в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке в концентрации, составляющей ≤ 10% (мас./мас.), ≤ 9,5% (мас./мас.), ≤ 9% (мас./мас.), ≤ 8,5% (мас./мас.), ≤ 8% (мас./мас.), ≤ 7,5% (мас./мас.), ≤ 7% (мас./мас.), ≤ 6,5% (мас./мас.), ≤ 6% (мас./мас.), 5,5% (мас./мас.), ≤ 5% (мас./мас.), ≤ 4,5% (мас./мас.), ≤ 4% (мас./мас.), ≤ 3,5% (мас./мас.), ≤ 3% (мас./мас.), ≤ 2,5% (мас./мас.), ≤ 2% (мас./мас.), ≤ 1,5% (мас./мас.), ≤ 1% (мас./мас.) или ≤ 0,5% (мас./мас.). В некоторых вариантах реализации изобретения буфер присутствует в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке в концентрации, составляющей 0,1-0,5% (мас./мас.), 0,5-1% (мас./мас.), 0,5-1,5% (мас./мас.), 1-2% (мас./мас.), 1,5-2,5% (мас./мас.), 2-3% (мас./мас.), 2,5-3,5% (мас./мас.), 3-4% (мас./мас.), 3,5-4,5% (мас./мас.), 4-5% (мас./мас.), 4,5-5,5% (мас./мас.), 5-6% (мас./мас.), 5,5-6,5% (мас./мас.), 6-7% (мас./мас.), 6,5-7,5% (мас./мас.), 8-9% (мас./мас.), 8,5-9,5% (мас./мас.) или 9-10% (мас./мас.).

В некоторых вариантах реализации изобретения буфер выбирают из буферов, которые включительно входят в диапазон pH от около 3 до около 9 или в диапазон pH от около 3,7 до около 8,0. Например, исходный материал белок-содержащего водного раствора может иметь pH, составляющий около 3,4, около 3,6, около 3,8, около 4,0, около 4,2, около 4,4, около 4,6, около 4,8, около 5,0, около 5,2, около 5,4, около 5,6, около 5,8, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,6, около 6,8, около 7,0, около 7,2, около 7,4, около 7,6, около 7,8 или около 8,0.

Буфер может представлять собой комбинацию отдельных буферов, таких как, например, комбинация гистидина и ацетата (гистидин-ацетатный буфер). В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации, составляющий от около 3,5 до около 6 или от около 3,7 до около 5,6, такой как диапазон, забуференный ацетатом. В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации, составляющий от около 5,5 до около 8,5 или от около 5,8 до около 8,0, такой как диапазон, забуференный фосфатом. В одном варианте реализации изобретения буфер имеет диапазон буферизации, составляющий от около 5,0 до около 8,0 или от около 5,5 до около 7,4, такой как диапазон, забуференный гистидином.

В одном варианте реализации изобретения заявленный приготовленный фармацевтический порошок не содержит дополнительного буфера. При этом любая буферная емкость порошкового или жидкого водного исходного материала обеспечивается включением белка, термостабилизатора, в случае его присутствия, или воды.

Поверхностно-активное вещество (одно или более) также может быть включено в исходный содержащий воду белоксодержащий материал для получения микрочастиц. В контексте данного документа термин "поверхностно-активное вещество" означает вещество, которое уменьшает поверхностное натяжение жидкости, в которой оно растворено, и/или уменьшает межфазное натяжение между маслом и водой. Поверхностно-активные вещества могут быть ионными или неионными. Типовые неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в исходный материал (а в последствии в приготовленный фармацевтический порошок), включают, например, алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид МЭА, кокамид ДЭА и кокамид ТЭА. Конкретные неионогенные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в исходный материал, включают, например, полиоксиэтиленсорбитановые эфиры (также называемые полисорбатами), такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полоксамеры, такие как полоксамер 188, полоксамер 407; полиэтилен-полипропиленгликоль; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как Твин 20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат.

Количество поверхностно-активного вещества, содержащегося в растворе исходного материала, может варьироваться в зависимости от конкретных свойств и целей, требуемых от порошка. На объемные свойства порошка, такие как сыпучесть, может влиять контроль содержания поверхностно-

активного вещества. Не желая быть связанными теорией, полагают, что поверхностно-активное вещество оказывает воздействие на границу раздела воздушной среды и поверхности водных белковых капель (исходный материал для заявленного порошка) за счет уменьшения поверхностного натяжения. Более высокие концентрации поверхностно-активного вещества приводят к получению более круглых и более гладких белковых микрочастиц, которые могут улучшать сыпучесть. Более низкие концентрации поверхностно-активного вещества приводят к получению менее круглых и более бугристых белковых микрочастиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходный водный раствор, содержащий заявленный белок, может содержать от около 0,015% (мас./об.) до около 0,1% (мас./об.) поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20 или полисорбата 80). Например, исходный материал может содержать около 0,015%; около 0,016%; около 0,017%; около 0,018%; около 0,019%; около 0,02%; около 0,021%; около 0,022%; около 0,023%; около 0,024%; около 0,025%; около 0,026%; около 0,027%; около 0,028%; около 0,029%; около 0,03%; около 0,031%; около 0,032%; около 0,033%; около 0,034%; около 0,035%; около 0,036%; около 0,037%; около 0,038%; около 0,039%; около 0,04%; около 0,041%; около 0,042%; около 0,043%; около 0,044%; около 0,045%; около 0,046%; около 0,047%; около 0,048%; около 0,049%; около 0,05%; около 0,051%; около 0,052%; около 0,053%; около 0,054%; около 0,055%; около 0,056%; около 0,057%; около 0,058%; около 0,059%; около 0,06%; около 0,061%; около 0,062%; около 0,063%; около 0,064%; около 0,065%; около 0,066%; около 0,067%; около 0,068%; около 0,069%; около 0,07%; около 0,071%; около 0,072%; около 0,073%; около 0,074%; около 0,075%; около 0,076%; около 0,077%; около 0,078%; около 0,079%; около 0,08%; около 0,081%; около 0,082%; около 0,083%; около 0,084%; около 0,085%; около 0,086%; около 0,087%; около 0,088%; около 0,089%; около 0,09%; около 0,091%; около 0,092%; около 0,093%; около 0,094%; около 0,095%; около 0,096%; около 0,097%; около 0,098%; около 0,099% или около 0,10% поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20 или полисорбата 80).

В одном варианте реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит амфипатическое неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как сложный эфир жирной кислоты полиоксиэтиленсорбитана. В одном варианте реализации изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80. В одном варианте реализации изобретения массовое отношение полисорбата к белку в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке составляет 0,003:1-1:5, 0,03:10, 0,3:50, 0,3:25, 1:50, 0,3:10, 3:50, 3:25 или 1:5.

Термостабилизаторы могут быть включены в приготовленный фармацевтический порошок и, следовательно, исходный водный раствор для ингибирования или уменьшения образования агрегатов и других продуктов разложения при термическом напряжении. Термостабилизаторами могут быть аминокислоты, предпочтительно аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, углеводы, сахарные спирты, полимеры, сополимеры и блок-сополимеры, полипептиды, поверхностно-активные вещества и т.п. Примеры пригодных термостабилизаторов включают Pluronic F68, аргинин, лизин, аминокислоты с гидрофобными боковыми цепями, включая глицин, пролин, валин, лейцин и изолейцин, сорбит, маннит, глицерин, трегалозу, декстрозу, сахарозу и другие углеводы, различные циклодекстрины, хлорид натрия и их комбинации. См. публикации Goldberg et al., "Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques: role of conformational and colloidal stability", 100(4) J. Pharm. Sci. 1306-1315, 2011 и Bhambhani et al., "Formulation design and high-throughput excipient selection based on structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions", 101(3) J. Pharm. Sci. 1120-1135, 2012.

Углевод может представлять собой восстанавливающий сахар или невосстанавливающий сахар. "Восстанавливающие сахара" включают, например, сахара с кетоновой или альдегидной группой и содержат реакционноспособную полуацетальную группу, которая обеспечивает сахару возможность выполнения функции восстановителя. Конкретные примеры восстанавливающих сахаров включают фруктозу, глюкозу, глицеральдегид, лактозу, арабинозу, маннозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, галактозу и мальтозу. Невосстанавливающие сахара могут содержать аномерный углерод, который представляет собой ацеталь и по сути не вступает в реакцию с аминокислотами или полипептидами с инициацией реакции Майара. Конкретные примеры восстанавливающих сахаров включают сахарозу, трегалозу, сорбозу, сукралозу, мелезитозу и раффинозу. Сахарные кислоты включают, например, сахаристые кислоты, глюконат и другие полигидроксисахара и их соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизаторы включены в состав, исходя из массового или молярного отношения к белку. Не желая быть связанными теорией, полагают, что термостабилизаторы частично заменяют воду, которая окружает белок, обеспечивая сохранение стабильности белка (водозамещение), тем самым обеспечивая возможность удаления воды с сохранением структуры белка. В соответствии с одним аспектом данного изобретения соотношение белка к стабилизатору максимизируется с обеспечением композиции, содержащей более высокие количества белка на единицу объема, с сохранением надлежащей структуры белка. В одном варианте реализации изобретения на каждые 5 частей белка по массе в приготовленном фармацевтическом порошке содержится ≤ 2 частей термостабилизатора по массе. Например, если исходный водный раствор для получения частиц содержит 5

мг/мл белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем ≤ 2 мг/мл, с поддержанием соотношения 5 частей белка к ≤ 2 частям термостабилизатора в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке. В одном варианте реализации изобретения на каждые 5 частей белка по массе в приготовленном фармацевтическом порошке приходится ≤ 1 части термостабилизатора по массе. Например, если исходный водный раствор содержит 5 мг/мл белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем ≤ 1 мг/мл, с поддержанием соотношения 5 частей белка по массе к ≤ 1 части термостабилизатора по массе в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке. В некоторых вариантах реализации изобретения весовое отношение белка к термостабилизатору составляет 5:2-100:1, 5:2-10:3, 20:7-4:1, 10:3-5:1, 4:1-20:3, 5:1-10:1, 20:3-20:1, 10:1-40:1, 20:1-50:1 или 40:1-100:1.

В другом варианте реализации изобретения на каждый моль белка приготовленный фармацевтический порошок содержит ≤ 300 моль термостабилизатора. Например, если исходный материал исходного водного раствора содержит 1 нМ белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем < 300 нМ, с поддержанием молярного соотношения термостабилизатора к белку на уровне < 300:1 в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке. В некоторых вариантах реализации изобретения молярное соотношение термостабилизатора к белку составляет 350:1-1:1, 350:1-300:1, 325:1-275:1, 300:1-250:1, 275:1-225:1, 250:1-200:1, 225:1-175:1, 200:1-150:1, 175:1-125:1, 150:1-100:1, 125:1-75:1, 100:1-50:1, 75:1-25:1 или 50:1 - < 1:1.

Компонент термостабилизатора может содержать более одной молекулярной частицы. Например, термостабилизатор может состоять из одного или более из сахарозы, трегалозы, маннита, аргинина (Arg) и гидрофобных аминокислот глицина (Gly), аланина (Ala), валина (Val), лейцина (Leu), изолейцина (Ile), пролина (Pro), фенилаланина (Phe), метионина (Met) и триптофана (Trp) в различных относительных количествах, добавляемых с доведением до общего совокупного количества термостабилизатора. В табл. 1 и 2 приведены примеры применяемых соотношений термостабилизатора и белка в конкретных водных растворах исходного материала, а в табл. 4 приведены примеры применяемых соотношений термостабилизатора и белка в конкретных приготовленных фармацевтических порошках, а также стабильность белка в порошке, полученном из этих композиций исходного материала табл. 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения заявленным термостабилизатором может являться макромолекула (> 200 г на моль). Макромолекулы, которые применяются в качестве термостабилизатора, включают дисахариды, такие как сахароза, трегалоза, лактоза, мальтоза, целлобиоза и т.п. Сахароза и трегалоза являются предпочтительными макромолекулярными стабилизаторами.

Таблица 1. Исходный материал фармацевтического порошка, содержащий термостабилизаторы

Образец	Белок	Термостабилизатор (мг/мл)			
	(мг/мл)	Сахароза	Трегалоза	Маннит	Изолейцин
1	50	10	-	-	-
2	50	20	-	-	-
3	50	10	-	5	5
4	50	-	10	-	-
5	50	-	20	-	-
6	50	-	10	5	5
7	50	-	-	10	10
8	50	-	-	-	-
9	50	-	10	-	-
10	50	-	20	-	-
11	50	-	10	-	-
12	5	1	-	-	-
13	5	2	-	-	-
14	5	1	-	0,5	0,5
15	5	-	1	-	-
16	5	-	2	-	-
17	5	-	1	0,5	0,5
18	5	-	-	1	1

Таблица 2. Исходный материал фармацевтического порошка, содержащий термостабилизаторы, буфер и поверхностно-активное вещество

КОМПОЗИЦИЯ	БЕЛОК (МГ/МЛ)	ФОСФАТ (НМ)	ТЕРМОСТАБИЛИЗАТОР САХАРОЗА (% МАС./ОБ.)	ТРЕГАЛОЗА (% МАС./ОБ.)	МАННИТ (% МАС./ОБ.)	ИЗОЛЕЙЦИН (% МАС./ОБ.)	ПОЛИСОРБАТ 20 (% МАС./ОБ.)
19	50	10	2				0,015
20	50	10	1				0,015
21	50	10	1		0,5	0,5	0,015
22	50	10		2			0,015
23	50	10		1	0,5	0,5	0,015
24	50	10			1	1	0,015
25	50	10	2				0,03
26	50	10	1				0,03
27	50	10	1		0,5	0,5	0,03
28	50	10		2			0,03
29	50	10		1	0,5	0,5	0,03
30	50	10			1	1	0,03
31	50	10	2				0,06
32	50	10	1				0,06
33	50	10	1		0,5	0,5	0,06
34	50	10		2			0,06
35	50	10		1	0,5	0,5	0,06
36	50	10			1	1	0,06
37	50	10	2				0,1
38	50	10	1				0,1
39	50	10	1		0,5	0,5	0,1
40	50	10		2			0,1
41	50	10		1	0,5	0,5	0,1
42	50	10			1	1	0,1
43	5	1	0,2				0,015
44	5	1	0,1				0,015
45	5	1	0,1		0,05	0,05	0,015
46	5	1		0,2			0,015
47	5	1		0,1	0,05	0,05	0,015
48	5	1			0,1	0,1	0,015
49	5	1	0,2				0,03
50	5	1	0,1				0,03
51	5	1	0,1		0,05	0,05	0,03
52	5	1		0,2			0,03
53	5	1		0,1	0,05	0,05	0,03
54	5	1			0,1	0,1	0,03
55	5	1	0,2				0,06
56	5	1	0,1				0,06
57	5	1	0,1		0,05	0,05	0,06
58	5	1		0,2			0,06
59	5	1		0,1	0,05	0,05	0,06
60	5	1			0,1	0,1	0,06
61	5	1	0,2				0,1
62	5	1	0,1				0,1
63	5	1	0,1		0,05	0,05	0,1
64	5	1		0,2			0,1
65	5	1		0,1	0,05	0,05	0,1
66	5	1			0,1	0,1	0,1

Таблица 3. Исходный материал фармацевтического порошка, содержащий термостабилизаторы, буфер и поверхностно-активное вещество

Образец	Компоненты жидкого исходного материала (мг/мл)							
	Белок	Сахароза	Трегалоза	Маннит	Изолейцин	Пролин	Фосфат	Полисорбат
67	50	0	0	0	0	0	1,5	0
68	5	0,5	0,25	0	0,25	0	0,15	0,15
69	5	0,5	0	0,25	0,25	0	0,15	0,15
70	5	0	0,5	0,25	0,25	0	0,15	0,15
71	5	0,5	0	0	0,5	0	0,15	0,15
72	5	0,5	0	0	0	0,5	0,15	0,15
73	5	0,5	0	0,5	0	0	0,15	0,15
74	5	1	0	0	0	0	0,15	0,15
75	5	2	0	0	0	0	0,15	0,2
76	5	2	0	0	0	0	0,15	0
77	5	0	2	0	0	0	0,15	0
78	5	0	1	0,5	0,5	0	0,15	0
79	50	5	0	0	0	0	1,5	0
80	50	10	0	0	0	0	1,5	0
81	50	5	0	2,5	2,5	0	1,5	0
82	50	20	0	0	0	0	1,5	0
83	50,6	9	0	4,5	4,5	0	1,35	0
84	50	10	0	10	0	0	1,5	0
85	50	10	0	0	10	0	1,5	0
86	50	10	0	5	5	0	1,5	0
87	50	0	0	10	10	0	1,5	0
88	50	0	0	20	0	0	1,5	0
89	50	0	0	0	20	0	1,5	0

Таблица 4. Коэффициенты соотношения компонентов фармацевтического порошка и степень агрегации

Образец	% мас./мас. гликопротеина в порошке	Весовое соотношение термостабилизатор/ Гликопротеин	Молярное соотношение термостабилизатор/ гликопротеин	Степень агрегации при 50°C (% HMW/месяц$^{-½}$)
67	97,5	0,0	0	20,0
68	82,0	0,2	93	10,3
69	82,0	0,2	109	9,4
70	82,0	0,2	106	9,5
71	82,0	0,2	121	8,6
72	82,0	0,2	133	8,4
73	82,0	0,2	97	9,3
74	82,0	0,2	67	11,8
75	71,6	0,4	134	7,6
76	73,4	0,4	134	8,2
77	73,4	0,4	122	8,5
78	73,4	0,4	212	5,7
79	90,1	0,1	34	14,8
80	83,8	0,2	67	12,5
81	83,8	0,2	109	12,2
82	73,4	0,4	134	8,2
83	75,6	0,4	194	7,5
84	73,4	0,4	193	6,2
85	73,4	0,4	243	6,0
86	73,4	0,4	218	5,4
87	73,4	0,4	302	4,9
88	73,4	0,4	253	6,8
89	73,4	0,4	351	7,8

В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный термостабилизатор содержит одну или более малых молекул (≤200 грамм на моль) без стабилизатора макромолекул. При данном весовом соотношении включение низкомолекулярных термостабилизаторов может максимизировать отношение термостабилизатора к белку в расчете на моль, тем самым обеспечивая преимущество для стабильности. Малые молекулы, которые применяются в качестве термостабилизатора, включают моносахариды, такие как рибоза, дезоксирибоза, глюкоза, фруктоза, галактоза и т.п., сахарные спирты и другие полиолы, такие как эритрит, глицерин, треит, арабит, ксилит, рибит, маннит, сорбит, галактит, фуцит, идит, инозит и т.п., и аминокислоты, такие как аргинин и гидрофобные аминокислоты глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан и т.п. Гидрофобные аминокислоты имеют алифатические боковые цепи с очень малыми дипольными моментами и головку (полярную) карбоновой кислоты. Поэтому свободные гидрофобные аминокислоты являются амфипатическими. Не желая быть связанными теорией, полагают, что амфипатический термостабилизатор может обеспечивать некоторую защиту белка от денатурации границы раздела водной и воздушной сред. Предпочтительные низкомолекулярные термостабилизаторы включают маннит, изолейцин и пролин.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит только сахарозу, только трегалозу, только изолейцин, только маннит или только пролин. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и трегалозы. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и трегалозы в весовом соотношении, составляющем 3:1-1:3, около 2:1, около 4:3, около 1:1, около 3:4 или около 1:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы, маннита и изолейцина. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы, маннита и изолейцина в весовом соотношении, составляющем 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 или 2:1:3.

В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленные фармацевтические порошки, содержащие сахарозу, имеют более высокую степень агрегации, чем порошки, в которых применяется маннит, изолейцин, пролин или их комбинации (фиг. 6).

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию трегалозы, маннита и изолейцина. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию трегалозы, маннита и изолейцина в весовом соотношении, составляющем 4:3:1, 2:1:1, 4:1:3, 2:3:1, 1:1:1 или 2:1:3.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и изолейцина. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и трегалозы в весовом соотношении, составляющем 3:1-1:3, около 2:1, около 4:3, около 1:1, около 3:4 или около 1:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и пролина. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и пролина в весовом соотношении, составляющем 3:1-1:3, около 2:1, около 4:3, около 1:1, около 3:4 или около 1:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и маннита. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию сахарозы и маннита в весовом соотношении, составляющем 3:1-1:3, около 2:1, около 4:3, около 1:1, около 3:4 или около 1:2.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию маннита и изолейцина. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор содержит комбинацию маннита и изолейцина в весовом соотношении, составляющем 3:1-1:3, около 2:1, около 4:3, около 1:1, около 3:4 или около 1:2.

В одном варианте реализации изобретения термостабилизатор представляет собой сахарозу, присутствующую в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке в весовом соотношении к белку, составляющем от около 1:5 до 2:5. В другом варианте реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит сахарозу, маннит, изолейцин и белок в весовом соотношении, составляющем около 2:1:1:10.

В одном варианте реализации изобретения термостабилизатор представляет собой трегалозу, присутствующую в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке в весовом соотношении к белку, составляющем от около 1:5 до 2:5. В другом варианте реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит трегалозу, маннит, изолейцин и белок в весовом соотношении, составляющем около 2:1:1:10.

В одном варианте реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит около 71-75% (мас./мас.) гликопротеина, 14-15% (мас./мас.) маннита, 14-15% (мас./мас.) изолейцина или пролина, 2-2,5% (мас./мас.) буфера и 3-8% (мас./мас.) воды.

В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок получают из водного раствора, содержащего заявленный белок и другие вспомогательные вещества. Этот исходный водный раствор также называется "исходный материал". В некоторых вариантах реализации изобретения исходный материал может содержать от около 0,005 до около 5% термостабилизатора; от около 0,01 до около 4% термостабилизатора; от около 0,02 до около 3% термостабилизатора или от около 0,05 до около 2% термостабилизатора в объемно-весовом соотношении (мас./об.). В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок согласно данному изобретению может содержать (мас./об.) около 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,04%; 0,05%; 0,06%; 0,07%; 0,08%; 0,09%; 0,10%; 0,11%; 0,12%; 0,13%; 0,14%; 0,15%; 0,16%; 0,17%; 0,18%; 0,19%; 0,20%; 0,21%; 0,22%; 0,23%; 0,24%; 0,25%; 0,26%; 0,27%; 0,28%; 0,29%; 0,30%; 0,31%; 0,32%; 0,33%; 0,34%; 0,35%; 0,36%; 0,37%; 0,38%; 0,39%; 0,40%; 0,41%; 0,42%; 0,43%; 0,44%; 0,45%; 0,46%; 0,47%; 0,48%; 0,49%; 0,50%; 0,51%; 0,52%; 0,53%; 0,54%; 0,55%; 0,56%; 0,57%; 0,58%; 0,59%; 0,60%; 0,61%; 0,62%; 0,63%; 0,64%; 0,65%; 0,66%; 0,67%; 0,68%; 0,69%; 0,70%; 0,71%; 0,72%; 0,73%; 0,74%; 0,75%; 0,76%; 0,77%; 0,78%; 0,79%; 0,80%; 0,81%; 0,82%; 0,83%; 0,84%; 0,85%; 0,86%; 0,87%; 0,88%; 0,89%; 0,90%; 0,91%; 0,92%; 0,93%; 0,94%; 0,95%; 0,96%; 0,97%; 0,98%; 0,99%; 1,0%; 1,1%; 1,2%; 1,3%; 1,4%; 1,5%; 1,6%; 1,7%; 1,8%; 1,9%; 2,0%; 2,1%; 2,2%; 2,3%; 2,4%; 2,5%; 2,6%; 2,7%; 2,8%; 2,9%; 3,0%; 3,1%; 3,2%; 3,3%; 3,4%; 3,5%; 3,6%; 3,7%; 3,8%; 3,9%; 4,0%; 4,1%; 4,2%; 4,3%; 4,4%; 4,5%; 4,6%; 4,7%; 4,8%; 4,9% или около 5,0% термостабилизаторов.

В аспекте данного изобретения, в котором в порошке отсутствует термостабилизатор, остаточная вода служит для стабилизации белка.

Белок, содержащийся в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке, не ограничивается каким-либо конкретным белковым соединением. В контексте данного документа термин "белок" включает терапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие рецептор-Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, человеческие антитела, биспецифические антитела, фрагменты антител, нанотела, рекомбинантные химеры антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как баккуловирусная система насекомых, системы дрожжей (например, Pichia sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Публикация Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins: Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation", 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012) включена в данный документ посредством ссылки для обозначения терапевтических белков и их получения.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок представляет собой терапевтический белок. Терапевтическими белками могут быть антигенсвязывающие белки, такие как, например, растворимые фрагменты рецепторов, антитела (в том числе IgG) и производные или фрагменты антител, другие белки, содержащие Fc, включая слитые белки, содержащие Fc, и рецептор-Fc-слитые белки, включая белки ловушечного типа, такие как, например, афлиберцепт (молекула-ловушка VEGF), рилонацепт (молекула-ловушка IL1) и этанерцепт (молекула-ловушка TNF). Публикация Huang, C, Curr. Opin. Biotechnol. 20: 692-99 (2009) включена в данный документ для обозначения молекул ловушечного типа. Патенты США № 7303746 B2, 7303747 B2 и 7374758 B2 включены в данный документ для предоставления информации об афлиберцепте. Патент США № 6927044 B2 включен в данный документ для предоставления инфор-

мации о рилонацепте. Патент США № 8063182 B2 включен в данный документ для предоставления информации о этанерцепте.

Термин "белок" включает любой аминокислотный полимер, содержащий более около 50 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или более цепей аминокислотного полимера, обычно известных в данной области техники как "полипептиды". Белок может содержать один или несколько полипептидов, образующих единую функционирующую биомолекулу. "Полипептиды", как правило, содержат более 50 аминокислот, тогда как "пептиды", как правило, содержат 50 аминокислот или менее.

Белки могут содержать различные ковалентные и нековалентные модификации. В некоторых белках могут присутствовать дисульфидные мостики (т.е. мостики между остатками цистеина, образующие цистин). Эти ковалентные связи могут находиться в пределах одной полипептидной цепи или между двумя отдельными полипептидными цепями. Например, дисульфидные мостики необходимы для обеспечения правильной структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и т.п. Последний обзор по образованию дисульфидных связей см. в публикации Oka and Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

Помимо образования дисульфидных связей белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Эти модификации включают липидирование (например, миристиолирование, пальмитоилирование, фарнезилирование, геранилгеранилирование и гликозилфосфатидилинозитоловое (ГФИ) якореобразование), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, добавление гликозильных групп к аргинину, аспарагину, цистеину, гидроксилизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану) и фосфорилирование (т.е. добавление фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Последний обзор по посттрансляционной модификации белков, продуцируемых у эукариот, см. в публикации Mowen and David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling," 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014) и Blixt and Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)," 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).

В одном варианте реализации изобретения белок, содержащийся в приготовленном фармацевтическом порошке, представляет собой гликопротеин, который охватывает любой белок, содержащий гликозильную группу. Антитела и рецептор-Fc-слитые белки (также известные как белки-ловушки или молекулы-ловушки) являются примерами гликопротеинов. Антитела, продуцируемые в гетерологичных системах млекопитающих, также гликозилируются в различных остатках (например, в остатках аспарагина) с различными полисахаридами и могут отличаться от вида к виду, что может влиять на антигенность терапевтических антител (см. публикацию Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)). N-гликаны молекул IgG, как правило, включают маннозилированный N-ацетилглюкозамин, который в некоторых случаях может включать дополнительные группы галактозы и/или фукозы. Антитела, как правило, имеют массу, составляющую около 150-170 кДа (кг/моль), с гликозилированием, обеспечивающим около 2-3% массы. См. публикацию Plomp et al., "Recent Advances in Clinical Glycoproteomics of Immunoglobulins (Igs)", Mol Cell Proteomics. 2016 Jul; 15 (7):2217-28.

Молекулы-ловушки N-гликозилируются аналогичным образом, так как они содержат Fc-домен иммуноглобулина. Молекулы-ловушки имеют больший диапазон молекулярной массы от около 50 кДа для этанерцепта, около 100 кД для афлиберцепта, до около 250 кД для рилонацепта. Учитывая меньший размер полипептидной цепи афлиберцепта, относительный уровень вклада гликозилирования в массу молекулы афлиберцепта больше, чем у антитела, т.е. около 5-16% от общей массы или более. Не желая быть связанными теорией, полагают, что разница в относительном гликозилировании различных белков может влиять на оптимальное отношение термостабилизатора к белку в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке.

Например, в одном конкретном варианте реализации изобретения, в котором белок представляет собой афлиберцепт, заявленная приготовленная фармацевтическая частица содержит около 62% полипептида, около 12% гликана, около 25% сахарозы и около 2% фосфата по массе. В другом конкретном варианте реализации изобретения, в котором белок представляет собой афлиберцепт, заявленная приготовленная фармацевтическая частица содержит около 71% полипептида, около 13% гликана, около 2% фосфата и около 14,1% сахарозы по массе.

Например, в конкретном варианте реализации изобретения, в котором белок представляет собой молекулу IgG1, заявленная приготовленная фармацевтическая частица содержит около 81% белка, около 1,5% гистидина, около 16% сахарозы и около 0,2% полисорбата 80 по массе.

Например, в конкретном варианте реализации изобретения, в котором белок представляет собой молекулу IgG4, заявленная приготовленная фармацевтическая частица содержит примерно 45% белка, около 0,4% ацетата, около 56% сахарозы и около 0,4% полисорбата 20 по массе.

Иммуноглобулины (также известные как "антитела") являются примерами белков, имеющих множественные полипептидные цепи и существенные посттрансляционные модификации. Канонический белок иммуноглобулина (например, IgG) содержит четыре полипептидные цепи - две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через дисульфидную связь цистина, а

две тяжелые цепи связаны друг с другом через две дисульфидные связи цистина. Иммуноглобулины, продуцируемые в системах млекопитающих, также гликозилируются в различных остатках (например, в остатках аспарагина) с различными полисахаридами и могут отличаться от вида к виду, что может влиять на антигенность терапевтических антител. Публикация Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014) включена в данный документ посредством ссылки для предоставления информации о гетерологичном продуцировании гликопротеинов в клеточных системах млекопитающих.

Антитела зачастую используются в качестве терапевтических биомолекул. В контексте данного документа термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (CDR тяжелой цепи могут сокращенно называться HCDR1, HCDR2 и HCDR3, CDR легкой цепи могут сокращенно называться LCDR1, LCDR2 и LCDR3. Термин "высокоаффинное" антитело относится к антителам, имеющим аффинность связывания с их мишенью, составляющую по меньшей мере 10-9 M, по меньшей мере 10-1 M; по меньшей мере 10-11 M; или по меньшей мере 10-12 M, при измерении посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или при определении аффинности в растворе методом ELISA.

Выражение "биспецифическое антитело" включает антитело, способное селективно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела, как правило, содержат две разные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), то аффинность первой тяжелой цепи для первого эпитопа, как правило, будет по меньшей мере на один-два или три, или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи для второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной или другой мишени (например, на том же или другом белке). Биспецифические антитела могут быть получены, например, посредством объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с нуклеотидными последовательностями, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут экспрессироваться в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типовое биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых содержит три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют (в направлении от N-конца к C-концу) домен CH1, шарнирный участок, домен CH2 и домен CH3, а также легкая цепь иммуноглобулина, которая не придает антигенсвязывающую специфичность, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или более эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами.

Выражение "тяжелая цепь" или "тяжелая цепь иммуноглобулина" включает последовательность константной области тяжелой цепи иммуноглобулина из любого организма и, если не указано иное, включает вариабельный домен тяжелой цепи. Вариабельные домены тяжелой цепи содержат три CDR тяжелой цепи и четыре области FR, если не указано иное. Фрагменты тяжелых цепей содержат CDR, CDR и FR, и их комбинации. Типичная тяжелая цепь имеет, следуя после вариабельного домена (в направлении от N-конца к C-концу), домен CH1, шарнирный участок, домен CH2 и домен CH3. Функциональный фрагмент тяжелой цепи включает фрагмент, который способен специфически распознавать антиген (например, распознавание антигена с величиной KD в микромолярном, наномолярном или пикомолярном диапазоне), который способен экспрессироваться и секретироваться из клетки и который содержит по меньшей мере одну CDR.

Выражение "легкая цепь" включает последовательность константной области легкой цепи иммуноглобулина из любого организма, и если не указано иное, включает легкие цепи каппа и лямбда человека. Вариабельные домены (VL) легкой цепи, как правило, содержат три CDR легкой цепи и четыре каркасные (FR) области, если не указано иное. Как правило, полноразмерная легкая цепь содержит, в направлении от аминоконца к карбоксильному концу, домен VL, который содержит FR1-CDR1-FR2-CDR2-

FR3-CDR3-FR4, и константный домен легкой цепи. Легкие цепи, которые могут использоваться согласно с этим изобретением, включают цепи, которые, например, не селективно связывают либо первый, либо второй антиген, селективно связанный антигенсвязывающим белком. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут быть идентифицированы посредством скрининга на предмет наиболее часто используемых легких цепей в существующих библиотеках антител (библиотеках в жидкостях или компьютерного моделирования), где легкие цепи по сути не препятствуют аффинности и/или селективности антигенсвязывающих доменов антигенсвязывающих белков. Подходящие легкие цепи включают цепи, которые могут связывать один или оба эпитопа, которые связаны антигенсвязывающими областями антигенсвязывающего белка.

Выражение "вариабельный домен" включает аминокислотную последовательность легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (модифицированной по желанию), которая содержит следующие аминокислотные области в последовательности от N-конца к С-концу (если не указано иное): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Выражение "вариабельный домен" включает аминокислотную последовательность, способную сворачиваться в канонический домен (VH или VL), обладающий двойной бета-складчатой структурой, где бета-складчатые слои соединены дисульфидной связью между остатком первого бета-складчатого слоя и второго бета-складчатого слоя.

Фраза "определяющая комплементарность область" или термин "CDR" включает аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью генов иммуноглобулина организма, которая обычно (т.е. у животного дикого типа) присутствует между двумя каркасными областями в вариабельной области легкой или тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина (например, антитела или рецептора Т-клеток). CDR может кодироваться, например, последовательностью зародышевой линии или перестроенной или неперестроенной последовательностью и, например, необученной или зрелой В-клеткой или Т-клеткой. В некоторых случаях (например, а случае CDR3) CDR могут кодироваться двумя или более последовательностями (например, последовательностями зародышевой линии), которые не являются смежными (например, в неперестроенной нуклеотидной последовательности), но являются смежными в нуклеотидной последовательности В-клеток, например, в результате сплайсинга или соединения последовательностей (например, рекомбинация V-D-J с образованием CDR3 тяжелой цепи).

Выражение "Fc-содержащий белок" включает антитела, биспецифические антитела, иммуноадгезины и другие связывающие белки, которые содержат, по меньшей мере, функциональный участок области CH2 и CH3 иммуноглобулина. "Функциональный участок" относится к области CH2 и CH3, которая может связывать Fc-рецептор (например, FcγR или FcRn, т.е. неонатальный Fc-рецептор) и/или которая может участвовать в активации комплемента. Если область CH2 и CH3 содержит делеции, замены и/или инсерции, или другие модификации, которые делают ее неспособной связывать любой Fc-рецептор и неспособной активировать комплемент, область CH2 и CH3 является нефункциональной.

Fc-содержащие белки могут содержать модификации в доменах иммуноглобулина, в том числе, если данные модификации влияют на одну или более эффекторных функций связывающего белка (например, модификации, которые влияют на связывание FcγR, связывание FcRn, а следовательно период полужизни и/или активность CDC). Такие модификации включают, но не ограничиваются ими, следующие модификации и их комбинации, со ссылкой на нумерацию EU константной области иммуноглобулина: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438 и 439.

Например, а не в качестве ограничения, связывающий белок представляет собой Fc-содержащий белок и демонстрирует увеличенное время полужизни в сыворотке (по сравнению с тем же Fc-содержащим белком без перечисленных модификаций) и имеет модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/SI/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В другом примере модификация может включать модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Некоторые рекомбинантные Fc-содержащие белки содержат рецепторы или фрагменты рецепторов, лиганды или фрагменты лигандов, которые имеют родственных партнеров по связыванию в биологических системах. "Рецептор-Fc-слитые белки" относятся к рекомбинантным молекулам, которые содержат растворимый рецептор, слитый с Fc-доменом иммуноглобулина. Некоторые рецептор-Fc-слитые белки могут содержать лигандсвязывающие домены нескольких разных рецепторов, которые влияют на данный. Эти рецептор-Fc-слитые белки известны как "ловушки" или "молекулы-ловушки". Рилонацепт и

афлиберцепт являются примерами доступных на рынке ловушек, которые противодействуют IL1R (см. патент США № 7927583) и VEGF (см. патент США 7087411) соответственно. Другие рекомбинантные Fc-содержащие белки включают рекомбинантные белки, содержащие пептид, слитый с Fc-доменом, например, технология MIMETIBODY™ от Centocor. Рекомбинантные Fc-содержащие белки описаны в публикации C. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

"Fc-слитые белки" включают часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в своем естественном состоянии. Получение слитых белков, содержащих некоторые гетерологичные полипептиды, слитые с разными участками полученных из антител полипептидов (в том числе домен Fc), описано, например, в публикациях Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. ScL USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990 и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецептор-Fc-слитые белки" содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах реализации изобретения содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок содержит две или более цепей разных рецепторов, которые связываются с одним или большим количеством лигандов. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc в hIgG1, см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме) или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc в hIgG1, например, SEQ ID №: 1, см. патенты США № 7087411 и 7279159, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме).

"Антагонист VEGF" относится к любому лекарственному препарату, лекарственному средству или другой молекуле, которая противодействует или иным образом снижает активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). VEGF является представителем семейства факторов роста PDGF. Он действует преимущественно на эндотелиальные клетки, стимулируя митогенез и миграцию клеток, и тем самым стимулируя васкулогенез и ангиогенез. VEGF можно использовать эктопически для лечения ишемии, в частности ишемической болезни сердца. Наоборот, антагонисты VEGF можно использовать для ингибирования ангиогенеза. Антиангиогенные средства применяют при лечении рака, поскольку опухолям необходима неоваскуляризация для продолжения роста и метастазирования, а также при лечении хориоидальной неоваскуляризации, которая приводит к влажной форме возрастной макулярной дегенерации. Для обзора VEGF и лекарственных средств, применяемых для стимулирования или ингибирования активности VEGF, см. публикации Wu et al., "A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use", 14(3) J. Cell Mol. Med. 528-52 (2010); Yadav et al., "Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review", 9(6) J. Clin. Diagn. Res. XE01-XE05 (2015); и I. Zachary, "VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology", 31 (Pt 6) Biochem. Soc. Trans. 1171-7 (2003).

Ингибиторы VEGF включают малые молекулы, которые ингибируют VEGF-стимулированные тирозинкиназы, в том числе, например, лапатиниб, сунитиниб, сорафениб, акситиниб и паксопаниб (Yadav, 2015). Макромолекулярные ингибиторы VEGF включают моноклональное антитело бевацизумаб, Fab-фрагмент ранибизумаб, ловушку афлиберцепт и ПЭГилированный аптамер пегатиниб (Id).

Другие факторы роста, участвующие в ангиогенезе и служащие в качестве терапевтических мишеней при неоваскуляризации, включают, в частности, ангиопоэтин-2 (Ang2) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF). Ang2 является составным элементом в пути ангиопоэтин-Tie (AT) и соответственно участвует в ремоделировании сосудов. Путь AT, в котором ангиопоэтин-1 связывает и выступает в роли агониста родственного рецептора Tie2, способствует выживанию эндотелиальных клеток и образованию, созреванию и поддержанию кровеносных сосудов. Ang2 также участвует в лимфангиогенезе. Ang2 также связывается с Tie2 и модулирует его сигнализацию, и по всей видимости выполняет функцию антагониста Tie2 в присутствии Ang1. См. публикации Thurston and Daly, "The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin - Tie Signaling Pathway", 2(9) Cold Spring Harb. Perspect. Med. a006650 (2012) и Chintharlapalli et al., "Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy," 73(6) Cancer Res. 1649-57 (2013).

Ang2 вызывает рак и воспаление. Он имеет повышенный уровень экспрессии в различных карциномах, цитомах и саркомах, а также при сепсисе и воспалительных заболеваниях. Ang2 играет роль в рекрутинге лейкоцитов. Блокировка Ang2 приводит к частичному ингибированию роста ксенотрансплантатов опухолей человека (Thurston, 2012). Антитела к Ang2 и другие пептидные ингибиторы, которые связываются с Ang2, находятся в стадии разработки для лечения заболеваний и состояний, вызываемых или усугубляемых ангиогенезом. Антитела к Ang2 описаны, например, в патентах США № 6166185; 7521053; 7205275; и публикациях заявок на патент США № 2006/0018909; 2006/0246071; 2006/068953; 2007/0154482 и 2011/0027286.

Система PDGF содержит семейство лигандов димерного фактора роста и рецепторные тирозинки-

назы. Она содержит пять (5) изоформ лиганда: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD и PDGF-AB; и два (2) рецептора: PDGFRA (альфа-рецептор) и PDGFRB (бета-рецептор). PDGF участвует в делении эмбриональных клеток и ремоделировании тканей, а также ангиогенезе на более поздней стадии развития. Ингибиторы киназ, например, сорафениб, нилотиниб, дазатиниб, сунитиниб, нинтеданиб и иматиниб, являются ингибиторами PDGF, применяемыми для лечения рака. Некоторые антитела к PDGFR также находятся в стадии разработки для противодействия PDGF-сигнализации для лечения рака и других связанных с ангиогенезом заболеваний. См. публикации Kono et al., "Adding to the mix: fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer", 12(2) Curr. Cancer Drug Targets 107-23 (2012); Bauman et al., "Antagonism of Platelet-Derived Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer: Rationale and Investigations", 13 Clin. Cancer Res. 4632s (2007) и Stock et al., "Platelet-derived growth factor receptor-α: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer", 6 Mol. Cancer Ther. 1932-41 (2007); патенты США № 5468468; 7740850; 8425911 и 8574578; и публикации заявок на патент США № 2009/0053241; 2011/0177074; 2012/0009199; 2012/0027767 и 2014/0193402.

Заявленный приготовленный фармацевтический порошок может быть изготовлен из исходного водного раствора (предшественника). Поэтому предлагаемый белок может быть включен в исходный материал в определенных концентрациях. Концентрация белка, а также общая концентрация растворенного вещества в исходном материале могут влиять на размер получаемой в результате входящей в состав порошка белковой микрочастицы, следовательно размер микрочастиц можно контролировать посредством регулирования концентрации белка или концентрации других растворенных веществ в исходном материале. Не желая быть связанными теорией, полагают, что более низкие концентрации белка или других растворенных веществ в исходном материале могут приводить к получению более тонкодисперсного порошка, содержащего входящие в состав белковые микрочастицы меньшего размера. Более высокие концентрации белка или других растворенных веществ в исходном материале могут приводить к получению более грубого порошка, содержащего входящие в состав белковые микрочастицы большего размера.

Концентрация белка в исходном водном растворе может варьироваться от всего лишь 1 мг/мл или менее до практически возможного количества, например около 175-200 мг/мл или более. В некоторых вариантах реализации изобретения исходный водный раствор содержит заявленный белок в концентрации, составляющей от около 1 до около 500 мг/мл белка; от около 5 до около 400 мг/мл белка; от около 5 до около 200 мг/мл белка; от около 25 до около 180 мг/мл белка; от около 25 до около 150 мг/мл белка; или от около 50 до около 180 мг/мл белка. В некоторых вариантах реализации изобретения исходный водный раствор содержит заявленный белок в концентрации, составляющей около 1 мг/мл; около 2 мг/мл; около 5 мг/мл; около 10 мг/мл; около 15 мг/мл; около 20 мг/мл; около 25 мг/мл; около 30 мг/мл; около 35 мг/мл; около 40 мг/мл; около 45 мг/мл; около 50 мг/мл; около 55 мг/мл; около 60 мг/мл; около 65 мг/мл; около 70 мг/мл; около 75 мг/мл; около 80 мг/мл; около 85 мг/мл; около 86 мг/мл; около 87 мг/мл; около 88 мг/мл; около 89 мг/мл; около 90 мг/мл; около 95 мг/мл; около 100 мг/мл; около 105 мг/мл; около 110 мг/мл; около 115 мг/мл; около 120 мг/мл; около 125 мг/мл; около 130 мг/мл; около 131 мг/мл; около 132 мг/мл; около 133 мг/мл; около 134 мг/мл; около 135 мг/мл; около 14 0 мг/мл; около 145 мг/мл; около 150 мг/мл; около 155 мг/мл; около 160 мг/мл; около 165 мг/мл; около 170 мг/мл; около 175 мг/мл; около 180 мг/мл; около 185 мг/мл; около 190 мг/мл; около 195 мг/мл; около 200 мг/мл; около 205 мг/мл; около 210 мг/мл; около 215 мг/мл; около 220 мг/мл; около 225 мг/мл; около 230 мг/мл; около 2 35 мг/мл; около 240 мг/мл; около 245 мг/мл; около 250 мг/мл; около 255 мг/мл; около 260 мг/мл; около 265 мг/мл; около 270 мг/мл; около 275 мг/мл; около 280 мг/мл; около 285 мг/мл; около 200 мг/мл; около 200 мг/мл или около 300 мг/мл.

Как описано выше, терапевтическим белком может быть антигенсвязывающий белок, такой как антитело, фрагмент антитела, молекула-ловушка или другой рецептор-Fc-слитый белок, растворимые рецепторы и т.п. В одном конкретном варианте реализации изобретения терапевтическим белком является афлиберцепт, молекула-ловушка антагониста VEGF. Растворы исходного материала для образования афлиберцептсодержащих микрочастиц могут содержать от около 1 до около 100 мг/мл афлиберцепта, около 2 мг/мл, около 3 мг/мл, около 4 мг/мл, около 5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 7 мг/мл, около 8 мг/мл, около 9 мг/мл, около 10 мг/мл, около 15 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл или около 100 мг/мл белка-ловушки VEGF. Растворы могут содержать один или более буферов в концентрации, составляющей от около 5 до около 50 мМ. В одном варианте реализации изобретения буфер содержит около 10 мМ фосфата при pH, составляющем около 6 ± 0,5.

В некоторых вариантах реализации изобретения белковые микрочастицы заявленного приготовленного фармацевтического порошка покрыты полимером. Термин "полимер" включает макромолекулы, содержащие повторяющиеся мономеры, связанные ковалентными химическими связями. Применяемые полимеры для терапевтических микрочастиц являются биосовместимыми и биоразлагаемыми. Биосо-

вместимый или биоразлагаемый полимер может быть природным или синтетическим. Природные полимеры включают полинуклеотиды, полипептиды, такие как природные белки, рекомбинантные белки, желатин, коллагены, фибрины, фиброин, полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцина и глутамата; и полисахариды, такие как альгинаты целлюлозы, декстран и декстрановые гидрогелевые полимеры, амилоза, инулин, пектин и гуаровая камедь, хитозан, хитин, гепарин и гиалуроновая кислота. Синтетические биосовместимые или биоразлагаемые полимеры включают полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер полимолочной и полигликолевой кислот (PLGA), поли-D,L-лактид-ко-гликолид (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексан] (pCPH), поли(гидроксимасляную кислоту-когидроксивалериановую кислоту) (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты) (ПЭГ-PLA), поли-ε-капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил)цианоакрилат (PEC), полиизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид (поли(HPMA)), поли-β-R-гидроксибутират (PHB), поли-β-R-гидроксиалканоат (PHA), поли-β-R-яблочную кислоту, фосфолипид-холестериновые полимеры, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/ПЭГ-DSPE)/холестерин, этилцеллюлозу, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полибутиленсукцинат (PBS), сложные полиортоэфиры, сополимеры сложного полиортоэфира и полиамидина, сополимеры сложного полиортоэфира и диамина, сложные полиортоэфиры, содержащие скрытые кислоты, для регулирования скорости разложения и, в частности, сополимеры поли(этиленгликоля)/поли(бутилентерефталата).

Этилцеллюлоза (EC) является хорошо известным и легко доступным биоматериалом, применяемым в фармацевтической и пищевой промышленности. Она представляет собой производное целлюлозы, в котором некоторые из гидроксильных групп глюкозы заменены этиловым эфиром. Публикация Martinac et al., 22(5) J. Microencapsulation 549-561 (2005) включена в данный документ для предоставления информации о применении этилцеллюлозы в качестве биосовместимого полимера при производстве микросфер. Патент США № 4210529 включен в данный документ для предоставления информации об этилцеллюлозе и производных этилцеллюлозы.

Поли-D,L-лактид-когликолид (PLGA) также является хорошо известным биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), применяемым в тканевой инженерии и системах доставки фармацевтических препаратов. PLGA представляет собой сложный полиэфир, содержащий мономеры гликолевой кислоты и молочной кислоты. Публикация Astete and Sabliov, 17(3) Biomater. Sci. Polym. Ed. 247-89 (2006) включена в данный документ для предоставления информации о синтезе PLGA и получении наночастиц из PLGA.

Поли-ε-капролактон (PCL) является другим биосовместимым и биоразлагаемым полимером, одобренным FDA для применения людьми в качестве устройства для доставки лекарственных средств. PCL представляет собой сложный полиэфир s-капролактона, который быстро гидролизуется в организме с образованием нетоксичной или низкотоксичной гидроксикарбоновой кислоты. Публикация Labet and Thielemans, 38 Chemical Society Reviews 3484-3504 (2009) включена в данный документ для предоставления информации о получении PCL. Публикация Sinha et al., 278(1) Int. J. Pharm. 1-23 (2004)) включена в данный документ для предоставления информации о получении микросфер и наносфер на основе PCL.

Сложный полиортоэфир (POE) представляет собой биоразрушаемый полимер, предназначенный для доставки лекарственных средств. Как правило, он представляет собой полимер кетенацеталя, предпочтительно циклического дикетенацеталя, такого как, например, 3,9-диметилен-2,4,8,10-тетраоксапиро [5,5]-ундекан, который полимеризуется посредством конденсации гликоля с образованием ортоэфирных связей. Сложные полиортоэфиры могут быть модифицированы для регулирования их профиля высвобождения лекарственного средства и скорости разложения посредством добавления или удаления различных гидрофобных диолов и полиолов, например, замены гексантриола декантриолом, а также добавления скрытых кислот, таких как октандикарбоновая кислота или т.п., к основанию для повышения чувствительности к изменению pH. Другие модификации сложного полиортоэфира включают интеграцию амина для увеличения функциональности. Патент США № 5968543; патент США № 4764364; патент США № 4304767; публикации Heller and Barr, 5(5) Biomacromolecules 1625-32 (2004); и Heller, 57 Adv. Drug. Deliv. Rev. 2053-62 (2005) включены в данный документ для предоставления информации о сложных полиортоэфирах.

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может быть сшит с образованием геля, в который включены белковые микрочастицы. Публикация Gibas and Janik, "Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications", 4(4) Chemistry & Chemical Technology 297-304 (2010) включена в данный документ для предоставления информации о сшитых ПЭГ гелях.

Полимеры, которые являются предпочтительными для применений, в которых задействуется тепло при распылительной сушке, имеют высокие температуры стеклования. В некоторых вариантах реализации изобретения высокая температура стеклования составляет ≥ 10°C, ≥ 15°C, ≥ 20°C, ≥ 25°C, ≥ 30°C, ≥

35°C, ≥ 45°C или ≥ 30°C.

В одном аспекте данное изобретение относится к способу получения заявленного приготовленного фармацевтического порошка посредством "распылительной сушки" исходного водного раствора, содержащего заявленный белок и любые дополнительные вспомогательные вещества (также называемого "исходным материалом", описанным в данном документе). Термин "распылительная сушка" означает способ получения порошка, состоящего из частиц микронного размера, из раствора, взвеси или суспензии с применением распылительной сушилки. В распылительных сушилках применяется распылитель или распылительная насадка для рассеивания взвеси или суспензии с получением спрея с каплями регулируемого размера. С помощью распылительной сушки могут быть получены капли размером от 10 до 500 мкм. По мере того как растворитель (вода или органический растворитель) высыхает, высыхает белковое вещество, превращаясь в частицу микронного размера (т.е. белковую микрочастицу), с образованием порошкообразного вещества; или в случае полимерной суспензии с белковыми микрочастицами - с образованием затвердевшей полимерной оболочки вокруг белкового содержимого. Распылительная сушка может быть выполнена на оборудовании, таком как, например, распылительная сушилка BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Флавиль, Швейцария). Публикация Elversson & Millqvist-Fureby, "Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein", 294(1,2) International Journal of Pharmaceutics 73-87 (2005) включена в данный документ посредством ссылки для предоставления информации о распылительной сушке.

В одном конкретном варианте реализации изобретения исходный материал закачивают в распылительную сушилку со скоростью, составляющей от около 2 до около 15 мл/мин или около 7 мл/мин. В одном варианте реализации изобретения давление в насадке составляет от около 35 до около 100 фунтов/кв.дюйм. В одном варианте реализации изобретения давление в насадке составляет около 75 фунтов/кв.дюйм. Температуру на входе в распылительную сушилку устанавливают на уровне, равном или превышающем точку кипения воды, например, от около 100 до 130°C. Температуру на выходе устанавливают на уровне ниже точки кипения воды и выше температуры окружающей среды, например, около 55°C. В одном конкретном варианте реализации изобретения белковый раствор (например, раствор белка-ловушки VEGF или раствор IgG) закачивают в распылительную сушилку BUCHI Mini Spray Dryer B-290 со скоростью, составляющей около 7 мл/мин, при температуре на входе, составляющей около 100, 110, 120 или 130°C, и температуре на выходе, составляющей около 55°C, при этом аспиратор устанавливают на уровне 33 $м^3$/ч и распыляют газ при 530 л/ч.

В одном варианте реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок получают посредством подвержения заявленного исходного материала распылению с образованием тумана из распыленных капель, а затем применения тепла к туману из распыленных капель с образованием приготовленного фармацевтического порошка, содержащего белок. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок подвергают дополнительной сушке (также известной как "вторичная сушка"). Дополнительная сушка включает горячую сушку, лиофилизацию и обдув азотом. В других вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок не подвергают дополнительной сушке. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок не подвергают последующей горячей сушке. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок не подвергают последующей лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок не подвергают последующей сушке посредством обдува азотом.

В одном варианте реализации изобретения исходный материал содержит термостабилизатор и гликопротеин при массовом соотношении около или в диапазоне 1:50-2:5. В одном варианте реализации изобретения на каждые 5 частей белка по массе исходный материал содержит ≤ 2 частей термостабилизатора по массе. Например, если исходный материал содержит 5 мг/мл белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем ≤ 2 мг/мл, с поддержанием соотношения 5 частей белка к ≤ 2 частям термостабилизатора в получаемом в результате заявленном приготовленном фармацевтическом порошке, как описано выше в данном документе. В одном варианте реализации изобретения на каждые 5 частей белка по массе исходный материал содержит ≤ 1 части термостабилизатора по массе. Например, если исходный материал содержит 5 мг/мл белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем ≤ 1 мг/мл, с поддержанием соотношения 5 частей белка по массе к 1 части термостабилизатора по массе в заявленном приготовленном фармацевтическом порошке, как описано выше в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения весовое отношение белка к термостабилизатору составляет 5:2-100:1, 5:2-10:3, 20:7-4:1, 10:3-5:1, 4:1-20:3, 5:1-10:1, 20:3-20:1, 10:1-40:1, 20:1-50:1 или 40:1-100:1.

В другом варианте реализации изобретения на каждый моль белка исходный материал содержит < 300 моль термостабилизатора. Например, если исходный материал содержит 1 нМ белка, то в итоге термостабилизатор будет включен в количестве, составляющем < 300 нМ, с поддержанием молярного соотношения термостабилизатора к белку на уровне < 300:1 в полученном заявленном приготовленном фар-

мацевтическом порошке, как описано выше в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения молярное соотношение термостабилизатора к белку составляет 350:1-1:1, 350:1-300:1, 325:1-275:1, 300:1-250:1, 275:1-225:1, 250:1-200:1, 225:1-175:1, 200:1-150:1, 175:1-125:1, 150:1-100:1, 125:1-75:1, 100:1-50:1, 75:1-25:1 или 50:1 - ≤ 1:1.

В еще одном варианте реализации изобретения исходный материал содержит белок без термостабилизатора.

В одном варианте реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок является абсолютно сухим, как описано выше в данном документе.

В другом варианте реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок не является абсолютно сухим, как описано выше в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок, который не является абсолютно сухим, содержит от около 3% до около 10% (мас./мас.) воды, 3,5-10% (мас./мас.) воды, 4-10% (мас./мас.) воды, 4,5-10% (мас./мас.) воды, 5-10% (мас./мас.) воды, 5,5-10% (мас./мас.) воды, 6-10% (мас./мас.) воды, 6,5-10% (мас./мас.) воды, 7-10% (мас./мас.) воды, 7,5-10% (мас./мас.) воды, 8-10% (мас./мас.) воды, 8,5-10% (мас./мас.) воды, 9-10% (мас./мас.) воды, 9,5-10% (мас./мас.) воды, >3-9% (мас./мас.) воды, >3-9% (мас./мас.) воды, >3-8,5% (мас./мас.) воды, >3-8% (мас./мас.) воды, >3-7,5% (мас./мас.) воды, >3-7% (мас./мас.) воды, >3-6,5% (мас./мас.) воды, >3-6% (мас./мас.) воды, >3-5,5% (мас./мас.) воды, >3-5% (мас./мас.) воды, >3-4,5% (мас./мас.) воды, >3-4% (мас./мас.) воды, >3-3,5% (мас./мас.) воды, около 3,1% (мас./мас.) воды, около 3,5% (мас./мас.) воды, около 4% (мас./мас.) воды, около 4,5% (мас./мас.) воды, около 5% (мас./мас.) воды, около 5,5% (мас./мас.) воды, около 6% (мас./мас.) воды, около 6,5% (мас./мас.) воды, около 7% (мас./мас.) воды, около 7,5% (мас./мас.) воды, около 8% (мас./мас.) воды, около 8,5% (мас./мас.) воды, около 9% (мас./мас.) воды, около 9,5% (мас./мас.) воды или около 10% (мас./мас.) воды.

В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор, содержащийся в заявленном исходном материале, содержит сахарозу или трегалозу, или комбинацию трегалозы и сахарозы.

В других вариантах реализации изобретения термостабилизатор, содержащийся в заявленном исходном материале, не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль. В некоторых вариантах реализации изобретения термостабилизатор, содержащийся в заявленном исходном материале, выбирают из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций.

В других вариантах реализации изобретения термостабилизатор, содержащийся в заявленном исходном материале, содержит трегалозу или сахарозу в комбинации с маннитом, изолейцином или пролином.

В одном варианте реализации изобретения заявленный исходный материал также содержит буфер. Предпочтительные буферы включают фосфатный, гистидиновый и ацетатный. В одном варианте реализации изобретения исходный материал содержит 0,5-10 мМ буфера.

В одном варианте реализации изобретения заявленный исходный материал не содержит буфер. При этом исходный материал буферизуется заявленным белком как таковым и водой.

В одном варианте реализации изобретения заявленный исходный материал также содержит неионный детергент. Неионные детергенты включают полисорбаты, такие как полисорбат 20 и полисорбат 80. В одном варианте реализации изобретения неионное поверхностно-активное вещество присутствует в исходном материале в концентрации, составляющей 0,01-0,2% (мас./об.).

В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный исходный материал содержит заявленный белок, один или более (i) буферов, (ii) термостабилизаторов, (iii) и/или поверхностно-активных веществ. В одном варианте реализации изобретения водный раствор содержит 2-200 мг/мл белка, 0,5-2% (мас./об.) термостабилизатора (термостабилизаторов), 1-10 мМ буфера (буферов) и 0,005-0,3% (мас./об.) поверхностно-активного вещества (веществ). В конкретном варианте реализации изобретения водный раствор содержит 50 мг/мл белка, 2% мас./об. одного или более термостабилизаторов, 10 мМ буфера и от 0,015% до 0,1% мас./об. одного или более неионных поверхностно-активных веществ. В другом варианте реализации изобретения водный раствор содержит 5 мг/мл белка, 0,2% мас./об. одного или более термостабилизаторов, 1 мМ буфера и от 0,015 до 0,1% мас./об. одного или более неионных поверхностно-активных веществ.

В другом варианте реализации изобретения входящие в состав порошка белковые микрочастицы, образуемые из заявленного исходного материала, впоследствии покрывают биоразлагаемым полимером. В некоторых вариантах реализации изобретения заявленный приготовленный фармацевтический порошок суспендируют в растворе полимера. В одном варианте реализации изобретения раствор полимера получают путем растворения полимера в органическом растворителе, таком как метиленхлорид, тетрагидрофуран, этилацетат, дихлорметан, этанол или какой-либо другой пригодный растворитель. Этилацетат широко известен как безопасный растворитель и часто применяется при приготовлении лекарственных средств, имплантатов и пищевых продуктов.

В некоторых вариантах реализации изобретения полимер может представлять собой этилцеллюлозу ("EC"), поли(молочную кислоту) ("PLA"), сложный полиортоэфир ("POE"), поли-D,L-лактид-ко-

гликолид ("PLGA") или поли-8-капролактон ("PCL"). В некоторых вариантах реализации изобретения полимер представляет собой полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сшитый полиэтиленгликоль (PEG), поли-D,L-лактид-ко-гликолид (PLGA), PLGA-этиленоксидфумарат, PLGA-альфа-токоферилсукцинат, этерифицированный до полиэтиленгликоля 1000 (PLGA-TGPS), полиангидрид поли[1,6-бис(п-карбоксифенокси)гексан] (pCPH), поли(гидроксимасляную кислоту-когидроксивалериановую кислоту) (PHB-PVA), сополимер полиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты) (ПЭГ-PLA), поли-ε-капролактон (PCL), полиалкилцианоакрилат (PAC), поли(этил)цианоакрилат (PEC), полиизобутилцианоакрилат, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид (поли (HPMA)), поли-β-R-гидроксибутират (PHB), поли-β-R-гидроксиалканоат (PHA), поли-β-R-яблочную кислоту, фосфолипид-холестериновые полимеры, 2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин/полиэтиленгликоль-дистеароилфосфатидилэтаноламин (DOPC/ПЭГ-DSPE)/холестерин, полисахариды, целлюлозу, этилцеллюлозу, метилцеллюлозу, альгинаты, декстран и декстрановые гидрогелевые полимеры, амилозу, инулин, пектин и гуаровую камедь, хитозан, хитин, гепарин, гиалуроновую кислоту, полиротаксаны и полипсевдоротаксаны на основе циклодекстрина (CD), полиаспартаты, полиглутаматы, полилейцин, сополимеры лейцина и глутамата, полибутиленсукцинат (PBS), желатин, коллагены, фибрины, фиброин, сложные полиортоэфиры, сополимер сложного полиортоэфира и полиамидина, сополимеры сложного полиортоэфира и диамина, сложные полиортоэфиры, содержащие скрытые кислоты, сополимер поли(этиленгликоля)/поли(бутилентерефталата), а также их комбинации и сополимеры.

Полимер может быть растворен в растворителе (например, этилацетате) в концентрации, составляющей от около 10 мг/мл до около 300 мг/мл (т.е. 1-30% [мас./об.]), от около 15 до около 295 мг/мл, от около 20 до около 290 мг/мл, от около 25 до около 280 мг/мл, от около 30 до около 270 мг/мл, около от 35 до около 265 мг/мл, от около 40 до около 260 мг/мл, от около 45 до около 260 мг/мл, от около 50 до около 255 мг/мл, от около 55 до около 250 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 75 мг/мл, около 100 мг/мл, около 125 мг/мл, около 150 мг/мл, около 175 мг/мл, около 200 мг/мл, около 225 мг/мл или около 250 мг/мл. В одном варианте реализации изобретения концентрация полимера при внутренней подаче распылительной сушилки составляет ≤ 10% (мас./об.), а концентрация полимера при внешней подаче составляет ≤ 25% (мас./об.).

Затем заявленный приготовленный белковый порошок добавляют к раствору полимера в концентрации, составляющей от около 10 до около 100 мг/мл, от около 15 до около 95 мг/мл, от около 20 до около 90 мг/мл, от около 25 до около 85 мг/мл, от около 30 до около 80 мг/мл, от около 35 до около 75 мг/мл, от около 40 до около 70 мг/мл, от около 45 до около 65 мг/мл, от около 50 до около 60 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл или около 50 мг/мл. Порошок и раствор полимера смешивают с образованием взвеси или суспензии, которую затем подвергают рассеиванию и сушке с получением приготовленного фармацевтического порошка с полимерным покрытием. Предпочтительный раствор полимера содержит полимер, растворенный в растворителе, который не растворяет суспендированные белковые частицы или их вспомогательные вещества. Например, в тех вариантах реализации, в которых порошок содержит сахарозу в качестве вспомогательного вещества, этанол не является предпочтительным, поскольку сахароза может растворяться в этаноле и оставлять после себя белок в частице, которая является нерастворимой.

В одном варианте реализации изобретения взвесь или суспензию из порошка и полимера подвергают распылительной сушке, которую выполняют способом, аналогичным способу получения заявленного приготовленного фармацевтического порошка, но со снижением температуры на входе (T_{in}) для защиты от воспламенения органического растворителя или полимера. Например, если органическим растворителем является дихлорметан, T_{in} может составлять 40°C; если растворителем является этилацетат, T_{in} может составлять 77°C и если растворителем является этанол, T_{in} может составлять 78°C. Вкратце, взвесь или суспензию из порошка и полимера закачивают в распылительную сушилку со скоростью, составляющей от около 0,5 до около 20 мл/мин, около 1,2 мл/мин, около 2,6 мл/мин или около 12,5 мл/мин. В одном варианте реализации изобретения для распыления суспензии применяют распылительную сушилку с насадкой с двойной подачей. В одном варианте реализации изобретения вязкость раствора полимера составляет < 20 сП при 20°C. В одном варианте реализации изобретения концентрация полимера при внутренней подаче составляет ≤ 10% (мас./об.), а концентрация полимера при внешней подаче составляет ≤ 25%. В одном варианте реализации изобретения микрочастицы суспендированы в растворе полимера при < 10% (мас./об.). В одном варианте реализации изобретения T_{in} зависит от растворителя, например, 40°C для дихлорметана, 77°C для этилацетата и 78°C для этанола. В одном варианте реализации изобретения T_{out} меньше, чем температура стеклования заявленного приготовленного фармацевтического порошка и зависит от T_{in}, скорости подачи, растворителя и аспиратора. В одном варианте реализации изобретения T_{max} насадки составляет < 150°C. В одном варианте реализации изобретения максимальная скорость подачи из внешнего канала составляет около 1,2 мл/мин, а максимальная скорость подачи из внутреннего канала составляет около 2,6 мл/мин. В одном варианте реализации изобретения мощность, подаваемая на ультразвуковой диспергатор распылительной сушилки, составляет около 0,5-2 Вт, а аспиратор установлен примерно на 80%.

Полученный в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием содержит входящие в состав белковые микрочастицы, окруженные полимерной оболочкой. Такие белковые микрочастицы с полимерным покрытием могут иметь любую из множества форм. В одном варианте реализации изобретения некоторые белковые микрочастицы с полимерным покрытием содержат от 1 до 50, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 10 или от 1 до 5 белковых микрочастиц, заключенных в одной белковой микрочастице с полимерным покрытием. В некоторых вариантах реализации изобретения отдельная белковая микрочастица с полимерным покрытием содержит 1, 2, 3, 4, 5, б, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 белковых микрочастиц. В некоторых вариантах реализации изобретения приготовленный фармацевтический порошок содержит белковую микрочастицу с полимерным покрытием, содержащую 1-2, 2-3 или 3-4 белковые микрочастицы.

В некоторых вариантах реализации изобретения белковые микрочастицы с полимерным покрытием имеют диапазон диаметров, составляющий от около 2 до около 70 мкм, от около 5 до около 65 мкм, от около 10 до около 60 мкм, от около 15 до около 55 мкм, от около 20 до около 50 мкм, около 15 мкм, около 20 мкм, около 25 мкм или около 30 мкм. Изменение размера в значительной степени отражает толщину полимерной оболочки, несмотря на то, что диаметр белковой оболочки может в некоторой степени способствовать изменению размера.

Регулирование начальной концентрации полимерного раствора или полимера как такового можно использовать для регулирования диаметра конечной частицы микронного размера.

В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием подвергают дополнительной сушке (также известной как "вторичная сушка"). Дополнительная сушка включает горячую сушку, лиофилизацию и обдув азотом. В других вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием не подвергают дополнительной сушке. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием не подвергают последующему высушиванию. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием не подвергают последующей лиофилизации. В некоторых вариантах реализации изобретения получаемый в результате приготовленный фармацевтический порошок с полимерным покрытием не подвергают последующей сушке посредством обдува азотом.

Микрочастицы с полимерным покрытием согласно данному изобретению применяют в терапевтических средствах с замедленным высвобождением или пролонгированным высвобождением белка. Например, предполагается, что микрочастицы афлиберцепта применяют для пролонгированного высвобождения афлиберцепта в стекловидном теле для лечения сосудистых глазных нарушений или для подкожной имплантации для пролонгированного высвобождения ловушки VEGF для лечения рака или других заболеваний.

Опубликованная заявка на патент США № US 2013/0129830 A1, которая была опубликована 23 мая 2013 г., и предварительная заявка на патент США № 62/405610, которая была подана 7 октября 2016 г., включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Примеры

Следующие примеры приведены таким образом, чтобы предоставить специалистам в данной области техники описание того, как создавать и использовать способы и композиции согласно данному изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением.

Пример 1. Параметры распылительной сушки

Предлагается способ получения приготовленного фармацевтического порошка, содержащего белок, посредством применения стадии распылительной сушки к водному раствору исходного материала, содержащему белок. Раствор исходного материала, содержащий 50 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ фосфата (pH 6,2) и 2% мас./об. сахарозы, подвергали распылительной сушке с применением сушилки BUCHI B-290 mini spray dryer (Флавиль, Швейцария). При этом температура на входе варьировалась от 100 до 130°C с шагом повышения в десять градусов, и ECD получаемых в результате частиц определяли посредством MFI. Как показано на фиг. 1, температура сушильного газа на входе не влияет на распределение по размерам или морфологию белковых микрочастиц.

При каждой температуре на входе, менее одного процента получаемых в результате частиц имели размер более 10 мкм. Кратковременное воздействие высоких температур и испарительное охлаждение предотвращали разложение белка афлиберцепта во время распылительной сушки.

Пример 2. Целостность и стабильность белка

Оценивали молекулярную целостность афлиберцепта в приготовленном фармацевтическом порошке, полученном после распылительной сушки. Восстановленный порошок афлиберцепта сравнивали с жидкой композицией афлиберцепта для офтальмологического введения и с исходной композицией, содержащей афлиберцепт. Офтальмологическая композиция содержала 40 мг/мл афлиберцепта, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, 40 мМ NaCl и 10 мМ фосфата, pH 6,2. Предвари-

тельно подвергнутый распылительной сушке исходный материал и восстановленные высушенные распылением композиции содержали 50 мг/мл афлиберцепта, 2% (мас./об.) сахарозы и 10 мМ фосфата, pH 6,2. Афлиберцепт в приготовленном фармацевтическом порошке, полученном после распылительной сушки, сохранял свою нативность и биологическую активность (см. табл. 5).

Стабильность афлиберцепта в высушенном распылением порошке оценивали посредством измерения образования высокомолекулярных частиц. Через 3, 6 и 12 месяцев с помощью SE-UPLC восстановленного белка определяли образование высокомолекулярных (HMW) частиц при 37°C. Высушенный распылением порошок афлиберцепта инкубировали при 37°C в сухих условиях и затем восстанавливали до 50 мг/мл афлиберцепта для анализа. Скорость образования HMW частиц определяли линейной регрессией квадратного корня времени для временных точек, собранных через 3, 6 или 12 месяцев при 37°C. Результаты, которые показаны в табл. 6, свидетельствуют о том, что скорость агрегации высушенного распылением афлиберцепта находится в пределах фармацевтически приемлемых параметров.

Таблица 5. Целостность высушенного распылением афлиберцепта

		Офтальмологическая композиция афлиберцепта	Предварительно подвергнутый распылительной сушке афлиберцепт	Восстановленный высушенный распылением афлиберцепт
% Восстановления (ОФ-ВЭЖХ)		99	100	96
Чистота (SE-UPLC)	% Нативный	99,3	99,1	99,0
Анализ вариантов, отличающихся зарядами (iCIEF)	% Основной	79,5	79,9	79,8
Чистота по SDS-PAGE (электрофорез в ДСН-ПААГ) (Невосстановленный)	% Основной	97,0	97,5	96,9
Чистота по SDS-PAGE (Восстановленный)	% Основной	99,0	99,0	99,0
mDSC	T_m1 (°C)	67,6	-	67,3
	T_m2 (°C)	85,3	-	85,6
FTIR	% α-Спираль	8,3	-	8,3
	% β-Лист	39,2	-	39,5
% Относительная активность (биоанализ)		84	109	103

Таблица 6. Стабильность приготовленных высушенных распылением порошков афлиберцепта

Размер частиц	Термостабилизаторы + Базовая композиция (50 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ фосфата, pH 6,2)	Скорость образования HMW частиц афлиберцепта при 37°C (% HMW/√мес. по SE-UPLC)
5 мкм	1% мас./об. Сахарозы	5,7%
5 мкм	2% мас./об. Сахарозы	3,7%

Пример 3. Термостабилизаторы

Было показано, что добавление вспомогательных веществ в исходный материал улучшает термостабильность микрочастиц белка. Лиофилизированный и высушенный распылением афлиберцепт (т.е. частицы размером 2,5 мкм, полученные из 5 мг/мл исходного материала афлиберцепта) инкубировали при 50°C в сухих условиях и восстанавливали до 5 мг/мл афлиберцепта для анализа. Результаты приведены в табл. 7. Сыпучесть порошка в композициях, содержащих маннит и изолейцин, оказалась похожей на сыпучесть композиций, содержащих только сахарозу или трегалозу. Включение маннита и изолейцина улучшало термостабильность высушенных распылением композиций, содержащих меньшие, т.е. 2,5 мкм, частицы.

Таблица 7. Термостабильность белковых микрочастиц размером 2,5 мкм

Формат	Размер частиц	Термостабилизаторы + Базовая композиция (5 мг/мл афлиберцепта, 1 мМ фосфата, pH 6,2)	Скорость образования HMW частиц афлиберцепта при 50°C (% HMW/√мес. по SE-UPLC)
Высушенные распылением	2,5 мкм	0,2% мас./об. сахарозы	8,5%
Высушенные распылением	2,5 мкм	0,2% мас./об. трегалозы	8,8%
Высушенные распылением	2,5 мкм	0,1% мас./об. сахарозы 0,05% мас./об. маннита 0,05% мас./об. Ile	5,9%

		0,1% мас./об. трегалозы	
Высушенные распылением	2,5 мкм	0,05% мас./об. маннита	5,7%
Высушенные распылением	2,5 мкм	0,05% мас./об. Ile 0,1% мас./об. маннита	7,0%
		0,1% мас./об. Ile	

Пример 4. Размер и форма частиц

Температуру на входе в насадку, включение поверхностно-активного вещества, концентрацию растворенного афлиберцепта и включение термостабилизаторов оценивали на предмет их влияния на размер или форму частиц. Концентрация белка и включение поверхностно-активного вещества в каждом случае приводили к получению более мелких, а в случае поверхностно-активного вещества, более круглых микрочастиц. Эти результаты обобщены в табл. 8.

Таблица 8. Размер и форма частиц

Параметр распылительной сушки	Влияние на размер частиц	Влияние на морфологию частиц	Влияние на стабильность белка
Температура на входе (110-130 °C)	Нет	Нет	Нет
+ Полисорбат 20 (<0,1% мас./об.)	Уменьшение	Более высокая сферичность	Нет
↓ Концентрация растворенного вещества	Уменьшение	Нет	Увеличение HMW частиц (~0,3%) *после* распылительной сушки Снижение скорости образования
+ Термостабилизатор	Нет	Нет	HMW в сухих условиях термического напряжения. Величина зависит от количества и типа термостабилизатора.

Как описано в примере 1, температура на входе варьировалась от 100 до 130°C с шагом повышения в десять градусов, и ECD получаемых в результате частиц определяли посредством MFI. Как показано на фиг. 1, температура сушильного газа на входе не влияет на распределение по размерам или морфологию частиц. При каждой температуре на входе, менее одного процента получаемых в результате частиц имели размер более 10 мкм.

Добавление 0,03-0,1% мас./об. полисорбата 20 к исходному материалу приводило к получению более мелких частиц при распылительной сушке по сравнению с растворами исходного материала, которые не содержали полисорбат 20 (фиг. 2). Порошок из композиций, содержащих более 0,1% мас./об. полисорбата 20, демонстрировал образование большего количества агломератов и был менее сыпучим (т.е. более липким). Порошки с низкой сыпучестью трудно поддаются обработке в последующих процессах. Поэтому композиции, содержащие менее 0,1% мас./об. полисорбата 20, являются предпочтительными. Было также обнаружено, что добавление 0,03% мас./об. полисорбата 20 к раствору исходного материала приводит к образованию более сферических частиц (т.е. к более высокому соотношению сторон [малая ось/большая ось]) при распылительной сушке (см. фиг. 3).

Более низкая концентрация растворенного вещества в растворе исходного материала приводила к уменьшению размера высушенных распылением частиц афлиберцепта до около 2,5 мкм (по сравнению с 5 мкм). Метод распылительной сушки с применением 50 мл/мл афлиберцепта, 10 мМ фосфата (pH 6,2), 2% сахарозы (мас./об.) в качестве раствора исходного материала приводил к получению частиц ~5 мкм в диаметре. Снижение концентрации растворенного вещества в 10 раз в растворе исходного материала (т.е. 5 мл/мл афлиберцепта, 1 мМ фосфата [pH 6,2], 0,2% сахарозы [мас./об.]) приводило к уменьшению размера белковых микрочастиц на половину до ~2,5 мкм (см. фиг. 4). Это означает 8-кратное уменьшение объема частицы (2^3). Распылительная сушка более разбавленного исходного материала требует в 10 раз больше времени (~1 час/г) для получения такого же количества порошка, как при применении композиций с более высокой концентрацией. Более высокое соотношение поверхности к объему белковых микрочастиц меньшего размера в сочетании с более длительным воздействием температуры на выходе во время распылительной сушки может подвергать белок термическому напряжению и может в некоторой степени снижать стабильность.

Пример 5. Полимерное покрытие

Белковые микрочастицы согласно данному изобретению могут быть покрыты полимером. Этот процесс может носить название "распыление". Вкратце, сложный полиортоэфир растворяли в дихлорметане, этилацетате или этаноле с доведением вязкости до около < 20 сП при 20°C. При применении насадки с двойной подачей (сушилка BUCHI B-290 mini spray dryer (Флавиль, Швейцария)) концентрация полимера составляла ≤ 10% (мас./об.) при внутренней подаче и ≤ 25% (мас./об.) при внешней подаче. Микрочастицы суспендировали в растворе полимера при менее чем 10% мас./об. T_{in} составляла 40°C, когда

растворителем был дихлорметан, 77°C, когда растворителем был этилацетат и 78°C, когда растворителем был этанол. T_{out} поддерживали ниже температуры стеклования (T_g) с применением тепловой рубашки, заполненной циркулирующей ледяной водой, для охлаждения циклона. T_{out} зависела от T_{in}, скорости подачи, типа растворителя и аспиратора. T_{max} насадки поддерживали ниже 150°C. Максимальные скорости подачи из внешнего канала и внутреннего канала насадки с двойной подачей составляли 1,2 и 2,6 мл/мин соответственно. Мощность, подаваемая на ультразвуковой диспергатор, составляла от 0,5 до 2 Вт; и аспиратор был установлен на 80%.

Посредством MFI (см. фиг. 5) наблюдали значительное изменение в распределении размеров в сторону более крупных частиц после нанесения методом распыления покрытия из сложного полиортоэфира (POE) на белковые микрочастицы.

Пример 6. Сравнение характеристик белков

Белок (афлиберцепт) из восстановленных белковых микрочастиц (Recon DP) сравнивали с предварительно подвергнутым распылительной сушке белком (Pre-SD FDS) и афлиберцептом, приготовленным в виде жидкой композиции (EYLEA® DP), с определением любых неблагоприятных эффектов, вызываемых распылительной сушкой. В одном эксперименте каждую из этих трех композиций подвергали скоростной седиментации - аналитическому ультрацентрифугированию (SV-AUC). Этот метод используют для детектирования и количественного определения белковых агрегатов (см. публикацию Arthus et al., "Detection of protein aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC): sources of variability and their relative importance", 98(10) J. Pharm. Sci. 3522-39, 2009). SV-AUC продемонстрировало, что все партии являются сопоставимыми с точки зрения HMW частиц (табл. 9). EYLEA® DP может иметь несколько более низкое содержание агрегатов, тогда как восстановленный высушенный распылением афлиберцепт может содержать агрегаты с изменением в сторону укрупнения частиц. Но, учитывая изменчивость повторных выборок, ни одна из этих тенденций не является явно значительной, и в целом эти результаты не дают четких или убедительных доказательств того, что эти три образца не являются сопоставимыми.

Таблица 9. Агрегация белка, определяемая посредством SV-AUC

	Коэффициент седиментации мономера, S (среднее значение ± CO)	% Предполагаемый димер (7,5-8,0 S) (среднее значение ± CO)	% Всего агрегатов (среднее значение ± CO)
EYLEA® DP	5,161 ± 0,004	1,3 ± 0,7	1,7 ± 1,2
Pre-SD FDS	5,181 ± 0,014	1,5 ± 0,5	2,2 ± 1,2
Recon DP	5,174 ± 0,002	1,5 ± 0,5	2,3 ± 1,2

В другом эксперименте каждую из этих трех композиций подвергали эксклюзионной хроматографии многоугловому лазерному светорассеянию (SEC-MALLS). Этот метод также используют для детектирования и количественного определения белковых агрегатов, а также неправильно свернутых белков (см. публикации P. J. Wyatt, "Light scattering and the absolute characterization of macromolecules", 272 Anal. Chim. Acta 1-40, 1993; Odaka et al., "Ligand-Binding Enhances the Affinity of Dimerization of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptorl", 122 J. Biochem. 116-121, 1997; J. S. Philo, "Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?" 8(3) AAPS J. E564-71, 2006). SEC-MALLS продемонстрировало, что все партии были сопоставимыми относительно процента площади пика и рассчитанной массы для каждого вида частиц (см. табл. 10).

Таблица 10. Агрегация белка, определяемая посредством SEC-MALLS

Образец	Пик 1 (HMW)		Пик 2 (основной - чистый)	
	ММ (кДа)	Площадь пика %	ММ (кДа)	Площадь пика %
EYLEA® DP	264,2 (0,0)	1,0 (0,4)	119,6 (1,0)	99,0 (0,0)
Pre-SD FDS	264,9 (3,0)	0,5 (0,0)	119,9 (0,0)	99,5 (0,0)
Recon DP	268,1 (6,0)	1,2 (0,0)	120,4 (1,0)	98,8 (0,0)

Три композиции афлиберцепта также подвергали капиллярно-электрофорезному (CE)-олигосахаридному фингерпринтингу (см. публикацию Chen et al., "Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis", 19(15) Electrophoresis 2639-44, 1998) и фингерпринтингу триптических фрагментов посредством сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии - масс-спектроскопии (UPLC-MS) (см. публикацию Sinha et al., "Comparison of LC and LC/MS methods for quantifying N-glycosylation in recombinant IgGs", 19(11) J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 1643-54, 2008) для оценки гликозилирования и других посттрансляционных модификаций, а также первичной последовательности. (CE)-олигосахаридный фингерпринтинг продемонстрировал, что все партии являются сопоставимыми (табл. 11).

Таблица 11. Посттрансляционные модификации

Посттрансляционная модификация		EYLEA® DP	Pre-SD FDS	Recon DP
С-концевые пептиды с и без Lys^{432}	Без Lys^{432}	96,2%	96,4%	96,5%
	С Lys^{432}	3,8%	3,6%	3,5%
Уровень дезамидирования (изоAsp) в мотиве Asn^{84}-Gly	Asn^{84}	78,9%	79,5%	79,3%
	изоAsp^{84}	21,1%	20,5%	20,7%
Уровень окисления в Met^{10}	Met^{10}	97,6%	97,5%	97,0%
	$Met(O)^{10}$	2,4%	2,5%	3,0%
Уровень окисления в Met^{192}	Met^{192}	96,6%	96,6%	96,4%
	$Met(O)^{192}$	3,4%	3,4%	3,6%
Уровень окисления в Met^{237}	Met^{237}	97,2%	97,2%	97,2%
	$Met(O)^{237}$	2,8%	2,8%	2,8%
Уровень пептида DYLTHR (связанный с полосой NR1)	^{91}DYLTHR^{96}	0,29%	0,34%	0,33%
Гликирование N-концевого пептида в Arg^{5}	Модифицированный N-конец	9,2%	9,0%	9,0%
Уровень не-гликозилирования Asn^{68}	Гликозилированный	64,3%	63,8%	64,6%
	Негликозилированный	35,7%	36,2%	35,4%

Хроматограммы пептидных карт в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях были визуально сопоставимыми среди трех образцов афлиберцепта. Никаких уникальных или значительных пиков, соответствующих мутантным последовательностям, в высушенном распылением образце не наблюдалось. Все посттрансляционные модификации присутствовали во всех образцах: удаление С-концевого лизина, дезамидирование аспарагина, окисление метионина и гликирование аспарагина. Профили сайт-специфичного гликозилирования в 5 N-связанных сайтах гликозилирования показаны во всех трех образцах. Профили дисульфидсвязанных пептидов во всех трех образцах соответствуют дисульфид-связывающим профилям, ожидаемым для афлиберцепта. На картах невосстановленных пептидов в трех анализируемых образцах не идентифицировали никаких значительных уровней рандомизированных или содержащих свободный цистеин пептидов. Результаты анализов пептидного картирования высушенного распылением афлиберцепта соответствовали эталонному стандарту EYLEA® DP.

Пример 7. Влияние влажности на стабильность белка в приготовленных фармацевтических порошках

Высушенные распылением композиции трех разных белков получали в соответствии со способом, описанным в примере 1. Четыре приготовленных порошка для каждого из трех белков получали с различным количеством влаги. Этими тремя белками были IgG1, IgG4 и молекула-ловушка (афлиберцепт). Каждый порошок афлиберцепта содержал 83,8% (мас./мас.) афлиберцепта, 2,1% (мас./мас.) фосфата и 14,1% (мас./мас.) сахарозы, а содержание воды находилось в диапазоне от < 0,5% до > 6%. Каждый порошок IgG1 содержал 80,9% (мас./мас.) IgG1, 1,5% (мас./мас.) гистидина, 16,4% (мас./мас.) сахарозы и 0,2% полисорбата 80, а содержание воды находилось в диапазоне от < 0,5% до > 6%. Каждый порошок IgG4 содержал 44,5% (мас./мас.) IgG1, 0,4% (мас./мас.) ацетата, 56,3% (мас./мас.) сахарозы и 0,4% полисорбата 20, а содержание воды находилось в диапазоне от < 0,5% до > 6%.

Порошки хранили при 50°C в течение 6 недель. Образцы получали через три недели, один месяц и шесть недель. Образцы восстанавливали, и оценивали белки на предмет изменения высокомолекулярных частиц посредством SE-UPLC. Скорость агрегации рассчитывали на основе значений HMW, полученных из восстановленных образцов. Результаты представлены в табл. 12.

Таблица 12. Влияние влаги в приготовленном фармацевтическом порошке на стабильность белка

Молекула	Содержание влаги (% воды, мас./мас.)	Скорость агрегации при 50 °C (% HMW/мес.$^{-½}$)
IgG4	0,36	1,08
	0,80	1,08
	3,71	1,38
	12,94	11,62
IgG1	0,01	12,60
	0,88	11,07
	5,31	8,74
	13,06	20,84
афлиберцепт	0,01	13,29
	0,92	12,47
	5,45	10,99
	14,12	27,20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения приготовленного фармацевтического порошка, включающий:

a) распылительную сушку водного раствора, содержащего:

i) по меньшей мере один термостабилизатор, выбранный из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций, и антитело или рецептор-Fc-слитый белок в массовом соотношении 1:5-2:5; и

ii) менее чем 0,1% (мас./об.) полисорбата 20;

причем распылительная сушка происходит при температуре на входе приблизительно 120°C и температуре на выходе приблизительно 55°C; и

b) применение тепла к указанному тонко распыленному водному раствору с образованием указанного приготовленного фармацевтического порошка, где тепло применяется к распыленному водному раствору для испарения воды из порошка, так чтобы полученный в результате приготовленный фармацевтический порошок имел влажность на уровне, равном 3-6%,

при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергают вторичной сушке и где порошок имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 2-200 мг/мл указанного рецептор-Fc-слитого белка и 0,1-2% (мас./об.) указанного термостабилизатора.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор содержит (i) маннит и (ii) изолейцин или пролин.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный водный раствор не содержит буфер.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 0,5-10 мМ буфер.

7. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 0,01-0,2% (мас./об.) неионного поверхностно-активного вещества.

8. Способ по п.1, дополнительно включающий суспендирование указанного приготовленного фармацевтического порошка в водном растворе, содержащем органический растворитель, такой как дихлорметан, этилацетат или этанол и биоразлагаемый полимер; и распылительную сушку указанной суспензии с образованием приготовленного фармацевтического порошка с нанесенным покрытием, при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергают вторичной сушке до образования указанного приготовленного фармацевтического порошка с нанесенным покрытием.

9. Способ получения приготовленного фармацевтического порошка, включающий:

a) распылительную сушку водного раствора, содержащего:

i) термостабилизатор, выбранный из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций, и антитело или рецептор-Fc-слитый белок в молярном соотношении, составляющем менее 300 моль указанного термостабилизатора на моль указанного антитела, или рецептор-Fc-слитого белка; и

ii) менее чем 0,1% (мас./об.) полисорбата 20;

причем распылительная сушка происходит при температуре на входе приблизительно 120°C и температуре на выходе приблизительно 55°C; и

b) применение тепла к указанному тонко распыленному водному раствору с образованием указанного приготовленного фармацевтического порошка, где тепло применяется к распыленному водному раствору, так что полученный в результате приготовленный фармацевтический порошок имеет влажность на уровне, равном 3-6%,

при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергают вторичной сушке и где порошок имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 2-200 мг/мл указанного рецептор-Fc-слитого белка и 0,1-2% (мас./об.) указанного термостабилизатора.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор содержит (i) маннит и (ii) изолейцин или пролин.

13. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный водный раствор не содержит буфер.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 0,5-10 мМ буфер.

15. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный водный раствор содержит 0,01-0,2% (мас./об.) неионного поверхностно-активного вещества.

16. Способ по п.9, дополнительно включающий суспендирование указанного приготовленного фармацевтического порошка в водном растворе, содержащем органический растворитель, такой как дихлорметан, этилацетат или этанол и биоразлагаемый полимер; и распылительную сушку указанной суспензии с образованием приготовленного фармацевтического порошка с нанесенным покрытием, при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергают вторичной сушке до образования указанного приготовленного фармацевтического порошка с нанесенным покрытием.

17. Приготовленный фармацевтический порошок, полученный в соответствии со способом по п.1, содержащий приблизительно 60-97% (мас./мас.) рецептор-Fc-слитого белка и приблизительно 3-40% (мас./мас.) термостабилизатора, выбранного из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций, при этом указанный приготовленный фармацевтический порошок содержит 3-6% воды, и указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергался вторичной сушке и где порошок имеет частицы, имеющие диаметр менее чем 10 мкм.

18. Приготовленный фармацевтический порошок по п.17, дополнительно содержащий 0,5-10 мМ буфера.

19. Приготовленный фармацевтический порошок по п.18, отличающийся тем, что указанный буфер выбирают из группы, состоящей из фосфатного, гистидинового и ацетатного.

20. Приготовленный фармацевтический порошок по п.17, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль.

21. Приготовленный фармацевтический порошок по п.17, отличающийся тем, что указанный термостабилизатор выбирают из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций.

22. Приготовленный фармацевтический порошок по п.17, содержащий 71-75% (мас./мас.) рецептор-Fc-слитого белка, 14-15% (мас./мас.) маннита, 14-15% (мас./мас.) изолейцина или пролина, 2-2,5% (мас./мас.) буфера и 3-8% (мас./мас.) воды.

23. Приготовленный фармацевтический порошок по п.17, дополнительно содержащий полимерное покрытие.

24. Способ получения приготовленного фармацевтического порошка, включающий:

a) распыление водного раствора, содержащего:

i) термостабилизатор и от 50 до 180 мг/мл белка-ловушки VEGF с массовым соотношением 1:5-2:5, где термостабилизатор выбран из сахарозы, трегалозы, маннита, изолейцина, пролина или их комбинации; и

ii) 0,03-0,1% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитанмонолаурата; где распылительная сушка происходит при температуре на входе от 100 до 130°C и температуре на выходе 55°C; и

b) применение тепла к указанному распыленному водному раствору для образования указанного приготовленного фармацевтического порошка, где тепло применяется к распыленному водному раствору таким образом, чтобы полученный фармацевтический порошок имел содержание влаги 3-6%,

где указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергается вторичной сушке и порошок содержит сферические частицы диаметром менее чем 10 мкм.

25. Способ по п.24, где указанный белок-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

26. Способ по п.24 или 25, где указанный термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль.

27. Способ по п.24 или 25, где указанный водный раствор содержит 0,1-2% (мас./об.) указанного термостабилизатора.

28. Способ по п.27, где указанный водный раствор не содержит буфера.

29. Способ по п.27, где указанный водный раствор содержит 0,5-10 мМ буфера.

30. Способ по п.27, где указанный водный раствор содержит 0,01-0,2% (мас./об.) неионогенного поверхностно-активного вещества.

31. Способ по п.24 или 25, дополнительно включающий суспендирование указанного приготовленного фармацевтического порошка в органическом растворителе, таком как дихлорметан, этилацетат или этанол, содержащем биоразлагаемый полимер; и распылительную сушку указанной суспензии с образованием фармацевтического порошка с покрытием, где указанный фармацевтический порошок с покрытием не подвергается вторичной сушке перед формированием указанного приготовленного фармацевтического порошка с покрытием.

32. Способ получения приготовленного фармацевтического порошка, включающий:

a) распыление водного раствора, содержащего:

i) термостабилизатор и от 50 до 180 мг/мл белка-ловушки VEGF при молярном соотношении менее 300 моль указанного термостабилизатора на моль указанного белка-ловушки VEGF, где термостабилизатор выбран из сахарозы, трегалозы, маннита, изолейцина, пролина или их комбинации; и

ii) 0,03-0,1% (мас./об.) полиоксиэтиленсорбитанмонолаурата, где распылительная сушка происходит при температуре на входе от 100 до 130°C и температуре на выходе 55°C; и

b) применение тепла к указанному распыленному водному раствору с образованием указанного приготовленного фармацевтического порошка, где тепло применяется к распыленному водному раствору таким образом, чтобы полученный приготовленный фармацевтический порошок имел влажность 3-6%,

где указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергается вторичной сушке и порошок содержит сферические частицы диаметром менее чем 10 мкм.

33. Способ по п.32, где указанный белок-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

34. Способ по п.32 или 33, где указанный термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более чем 200 г/моль.

35. Способ по п.32 или 33, где указанный термостабилизатор выбран из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций.

36. Способ по п.32 или 33, где указанный водный раствор содержит 0,1-2% (мас./об.) указанного термостабилизатора.

37. Способ по п.32 или 33, где указанный водный раствор не содержит буфер.

38. Способ по п.32 или 33, где указанный водный раствор содержит 0,5-10 мМ буфера.

39. Способ по п.32 или 33, где указанный водный раствор содержит 0,01-0,2% (мас./об.) неионогенного поверхностно-активного вещества.

40. Способ по п.32 или 33, дополнительно включающий суспендирование указанного приготовленного фармацевтического порошка в органическом растворителе, таком как дихлорметан, этилацетат или этанол, содержащем биоразлагаемый полимер; и распылительную сушку указанной суспензии с образованием фармацевтического порошка с покрытием, где указанный приготовленный фармацевтический порошок с покрытием не подвергается вторичной сушке перед формированием указанного приготовленного фармацевтического порошка с покрытием.

41. Приготовленный фармацевтический порошок, полученный в соответствии со способом по п.1, содержащий 60-97% (мас./мас.) белка-ловушки VEGF и 3-40% (мас./мас.) термостабилизатора, где термостабилизатор выбран из сахарозы, трегалозы, маннита, изолейцина, пролина или их комбинации и где указанный приготовленный фармацевтический порошок содержит 3-6% воды, где указанный приготовленный фармацевтический порошок не подвергается вторичной сушке.

42. Приготовленный фармацевтический порошок п.41, дополнительно содержащий 0,5-10 мМ буфера.

43. Приготовленный фармацевтический порошок п.42, где указанный буфер выбран из группы, состоящей из фосфата, гистидина и ацетата.

44. Приготовленный фармацевтический порошок п.41, где указанный белок-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

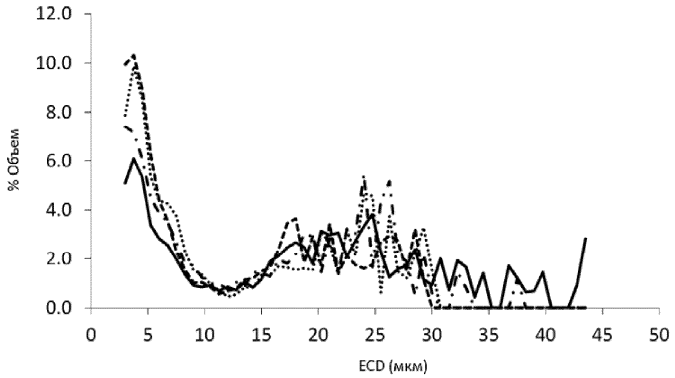
45. Приготовленный фармацевтический порошок п.41 или 44, где термостабилизатор не содержит молекулу с молекулярной массой более 200 г/моль.

46. Приготовленный фармацевтический порошок п.41 или 44, где термостабилизатор выбран из группы, состоящей из маннита, изолейцина, пролина и их комбинаций.

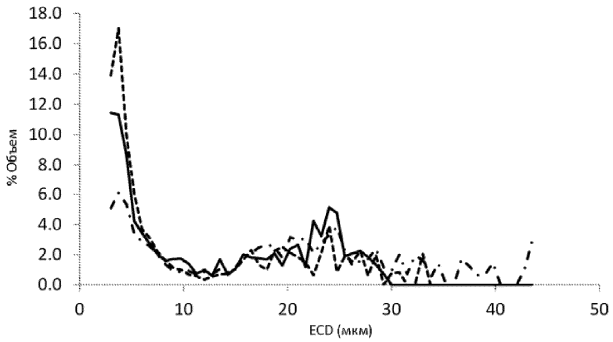
47. Приготовленный фармацевтический порошок по любому из пп.41 или 44, содержащий 71-75% (мас./мас.) белка-ловушки VEGF, 14-15% (мас./мас.) маннита, 14-15% (мас./мас.) изолейцина или пролина, 2-2,5% (мас./мас.) буфера и 3-8% (мас./мас.) воды.

48. Приготовленный фармацевтический порошок п.41, где указанный белок-ловушка VEGF представляет собой антитело или рецептор-Fc-слитый белок.

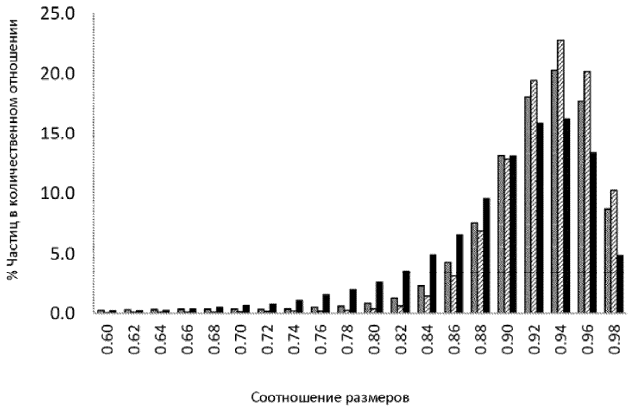
49. Приготовленный фармацевтический порошок по п.41 или 44 дополнительно содержащий полимерное покрытие.



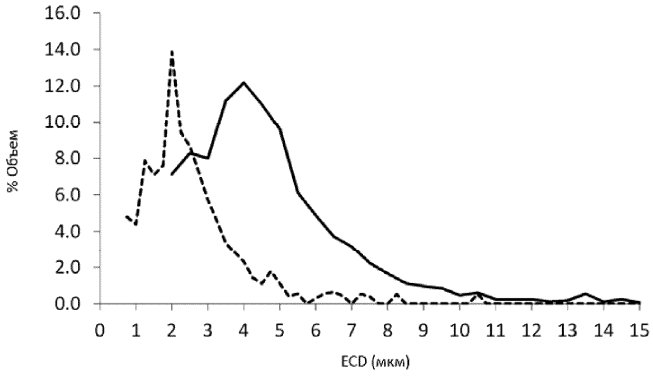
Фиг. 1



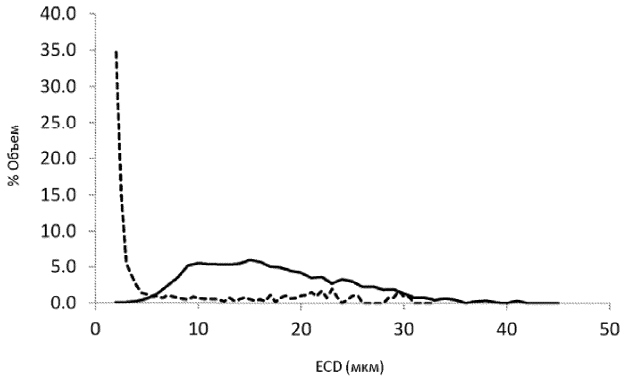
Фиг. 2



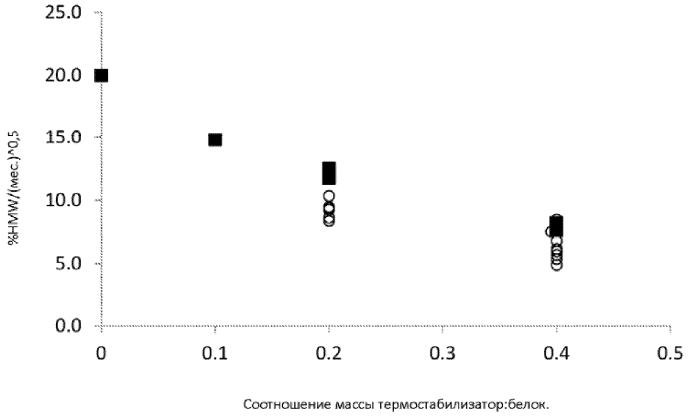
Фиг. 3



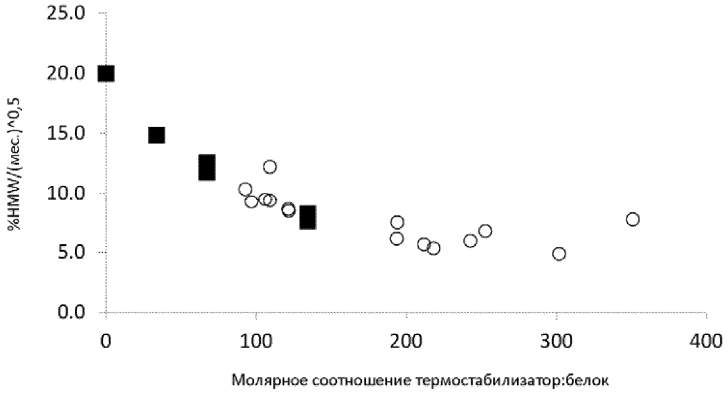
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6A



Фиг. 6B