

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 041785

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2022.12.02

(21) Номер заявки  
201990998

(22) Дата подачи заявки  
2017.10.19

(51) Int. Cl. A61K 9/08 (2006.01)  
A61K 31/70 (2006.01)  
A61K 47/42 (2017.01)  
A61P 29/00 (2006.01)  
C07K 1/34 (2006.01)  
C07K 14/705 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 62/411,458

(32) 2016.10.21

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/US2017/057472

(87) WO 2018/075818 2018.04.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Госс Моника, Болл Николь (US)

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

(56) US-A1-20070243185  
US-A1-20110171217  
US-A1-20140072560  
US-A1-20100137213  
US-A1-20090291062  
US-A1-20150313996  
WO-A1-2014177548  
US-A1-20140186351  
WO-A1-2014078627  
WO-A1-2014064637

(57) Изобретение относится к составу фармацевтических композиций на основе этанерцепта. Изобретение также относится к способам удаления буфера и составления фармацевтических композиций на основе этанерцепта.

041785 B1

041785 B1

041785

B1

### **Перекрестная ссылка на родственную заявку**

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/411458, поданной 21 октября 2016 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Область изобретения**

Настоящее изобретение относится к составам фармацевтических композиций на основе этанерцепта. Кроме того, изобретение относится к способам удаления буфера и составления фармацевтических композиций на основе этанерцепта.

### **Предпосылки изобретения**

Состав на основе белкового лекарственного средства может представлять множество проблем для ученого-фармацевта. Существует необходимость в составе, который стабилизирует белковое лекарственное средство и делает его стабильным по отношению к деградации, обусловленной протеолизом, агрегацией, неправильной укладкой и т.д. В частности, для сконструированных белков, которые существенно отличаются от известных белков, установить подходящие условия стабильности может быть непростой задачей. Также желательно, чтобы белковое лекарственное средство находилось в форме, удобной для пациента. Требуемые свойства включают стабильность при комнатной температуре и при охлаждении; пригодность для длительного хранения, подходящей периодичности и объемов введения доз и сведение к минимуму ощущений дискомфорта при введении.

Этанерцепт представляет собой димерный слитый белок, состоящий из внеклеточной лигандсвязывающей части человеческого рецептора фактора некроза опухоли (TNFR) размером 75 кДа (p75), связанной с Fc-частью человеческого IgG1. Fc-компонент этанерцепта содержит CH2-домен, CH3-домен и шарнирный участок, но не содержит CH1-домен IgG1. При экспрессии в клетках млекопитающих он образует гомодимерный комплекс с двумя доменами рецептора TNF. Таким образом, он представляет собой искусственный белок, который отличается как от антител, так и от растворимых рецепторов TNF, и поэтому подвергается другим путям деградации, чем каждый из них. Этанерцепт коммерчески доступен под торговой маркой ENBREL® (Amgen Inc., Таузенд-Оукс, Калифорния) и одобрен для лечения активного ревматоидного артрита со степенью тяжести от умеренной до тяжелой, активного полиартикулярного ювенильного идиопатического артрита (JIA) со степенью тяжести от умеренной до тяжелой у пациентов возрастом двух лет и старше, хронического бляшковидного псориаза (PsO) со степенью тяжести от умеренной до тяжелой у взрослых, псориатического артрита (PsA) у взрослых и активного анкилозирующего спондилита (AS). Этанерцепт был исходно доступен в виде лиофилизированного состава для восстановления непосредственно перед инъекцией.

После восстановления лиофилизированного продукта водой для инъекций состав содержит 10 mM Трис-HCl, 4% маннит, 1% сахарозу, pH 7,4 при концентрации приблизительно 25 мг/мл. Однако этот состав не стабилен при хранении. Было обнаружено, что жидкий состав на основе этанерцепта можно получить с использованием аргинина с целью стабилизации белка (см. патент США № 7648702). Иллюстративный жидкий состав состоит из 50 мг/мл этанерцепта, 25 mM фосфатного буфера, 25 mM L-аргинина гидрохлорида, 100 mM NaCl, 1% сахарозы при pH 6,3 в воде.

### **Краткое описание изобретения**

В данном документе предусмотрены новые и усовершенствованные составы на основе этанерцепта. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие этанерцепт, которые являются стабильными и которые удобно хранить в виде жидкости при контролируемой комнатной температуре (CRT) в течение продолжительных периодов времени, даже при отсутствии дополнительного буферного средства. Кроме того, если фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят субъектам, то они также демонстрируют существенно сниженные болевые ощущения при инъекции по сравнению с коммерчески доступным составом из известного уровня техники. Таким образом, эти фармацевтические композиции являются более удобными и предпочтительными для пациентов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы составления фармацевтических препаратов на основе этанерцепта при требуемом показателе pH, но в отсутствие дополнительного буферного средства в конечном составе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, NaCl, аргинин и сахарозу, где фармацевтическая композиция по существу не содержит дополнительное буферное средство, а показатель pH композиции составляет от 6,1 до 6,5. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция способна поддерживать показатель pH в диапазоне от 6,1 до 6,5 при хранении при контролируемой комнатной температуре (CRT) в течение 2 недель. В другом варианте осуществления концентрация этанерцепта составляет от 40 до 100 мг/мл. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция является изотонической. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит от 20 до 150 mM NaCl, от 5 до 100 mM аргинина и от 0,5 до 2% (вес./об.) сахарозы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество. В другом варианте осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 80 или полуксамер 188. В другом варианте осу-

ществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 при концентрации (вес./об.) от 0,001 до 0,1%. В другом варианте осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 при концентрации (вес./об.) от 0,001 до 0,1%. В другом варианте осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188 при концентрации (вес./об.) от 0,01 до 0,3%. В другом варианте осуществления показатель pH фармацевтической композиции поддерживается в диапазоне от 5,8 до 6,7 в течение по меньшей мере двух недель при хранении приблизительно при 25°C, где менее 6% от общего этанерцепта агрегировано в высокомолекулярной форме, что было определено с применением эксклюзионной хроматографии. В другом варианте осуществления показатель pH фармацевтической композиции поддерживается в диапазоне от приблизительно 6,1 до приблизительно 6,5. В другом варианте осуществления менее 28% от общего количества этанерцепта находится в неправильно уложенной форме, что определено с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу состоит и приблизительно из 40-100 мг/мл этанерцепта, приблизительно 120 мМ NaCl, приблизительно 25 мМ аргинина, приблизительно 1% сахарозы и воды. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу состоит из приблизительно 40-100 мг/мл этанерцепта, приблизительно 120 мМ NaCl, приблизительно 25 мМ аргинина, приблизительно 1% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 20 и воды.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ составления фармацевтической композиции на основе этанерцепта с удалением дополнительного буферного средства и поддержанием показателя pH в диапазоне от 6,1 до 6,5, предусматривающий составление состава на основе этанерцепта в составе, содержащем дополнительное буферное средство при pH от 6,1 до 6,5, и замену состава, содержащего дополнительное буферное средство, против состава, который не содержит дополнительное буферное средство и характеризуется pH от 5,6 до 6,5, и сбор полученного фармацевтического состава. В одном варианте осуществления на стадии замены применяют диафильтрацию. В другом варианте осуществления состав, который не содержит дополнительное буферное средство, является изотоническим. В другом варианте осуществления состав, который не содержит дополнительное буферное средство, содержит сахарозу, аргинин и NaCl. В другом варианте осуществления состав, который не содержит дополнительное буферное средство, содержит от 20 до 150 мМ NaCl, от 5 до 100 мМ аргинина и от 0,5 до 2% (вес./об.) сахарозы. В другом варианте осуществления состав, который не содержит дополнительное буферное средство, по существу состоит из приблизительно 120 мМ NaCl, приблизительно 25 мМ аргинина, приблизительно 1% сахарозы и воды. В другом варианте осуществления способ составления фармацевтической композиции на основе этанерцепта дополнительно предусматривает добавление полисорбата. В другом варианте осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 20 при концентрации (вес./об.) от 0,001 до 0,1%. В другом варианте осуществления способ составления фармацевтической композиции на основе этанерцепта дополнительно предусматривает фильтрацию фармацевтической композиции. В другом варианте осуществления способ составления фармацевтической композиции на основе этанерцепта дополнительно предусматривает разделение фармацевтической композиции на аликваты в виде готовой лекарственной формы.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий фармацевтическую композицию на основе этанерцепта, описанную выше, в виде готовой лекарственной формы и инструкции по хранению и применению.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, NaCl, аргинин, сахарозу, фосфатный буфер и бензиловый спирт, где показатель pH композиции составляет от 6,1 до 6,5. В одном варианте осуществления бензиловый спирт имеет концентрацию (об./об.) от 0,1 до 5,0%. В другом варианте осуществления концентрация бензинового спирта составляет приблизительно 0,9%. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, дополнительно содержит полисорбат 20 при концентрации (вес./об.) от 0,001 до 0,1%. В другом варианте осуществления концентрация полисорбата 20 составляет приблизительно 0,004%. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, по существу состоит из этанерцепта при концентрации, составляющей приблизительно 40-100 мг/мл, аргинина при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, хлорида натрия при концентрации, составляющей приблизительно 100 мМ, сахарозы при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 1%, фосфатного буфера при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, и бензинового спирта при концентрации (об./об.), составляющей приблизительно 0,9%. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, по существу состоит из этанерцепта при концентрации, составляющей приблизительно 40-100 мг/мл, аргинина при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, хлорида натрия при концентрации, составляющей приблизительно 100 мМ, сахарозы при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 1%, фосфатного буфера при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, бензинового спирта при концентрации (об./об.), составляющей приблизительно 0,9%, и полисорбата 20 при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 0,004%.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен однодозовый контейнер, содержащий

описанную выше фармацевтическую композицию, содержащую этанерцепт. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу состоит из этанерцепта при концентрации, составляющей приблизительно 40-100 мг/мл, аргинина при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, хлорида натрия при концентрации, составляющей приблизительно 100 мМ, сахарозы при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 1%, фосфатного буфера при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, и бензилового спирта при концентрации (об./об.), составляющей приблизительно 0,9%. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу состоит из этанерцепта при концентрации, составляющей приблизительно 40-100 мг/мл, аргинина при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, хлорида натрия при концентрации, составляющей приблизительно 100 мМ, сахарозы при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 1%, фосфатного буфера при концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, бензилового спирта при концентрации (об./об.), составляющей приблизительно 0,9%, и полисорбата 20 при концентрации (вес./об.), составляющей приблизительно 0,004%. В другом варианте осуществления однодозовый контейнер представляет собой флакон, шприц или шприц-ручку. В другом варианте осуществления однодозовый контейнер содержит водный состав, состоящий из этанерцепта при концентрации 50,0 мг/мл, хлорида натрия при концентрации 120 мМ, L-аргинина при концентрации 25 мМ, сахарозы при концентрации 1,0% (вес./об.).

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения однодозового контейнера, содержащего описанную выше фармацевтическую композицию, содержащую этанерцепт, предусматривающий заполнение однодозового контейнера приблизительно однократной дозой фармацевтической композиции в стерильных условиях.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показан процент HMW (пик В), выявленный при помощи SEC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта в примере 3.

На фиг. 2 показан процент LMW, выявленный при помощи dSEC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта в примере 3.

На фиг. 3 показан процент пика 3, выявленный при помощи HIC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта в примере 3.

На фиг. 4 показан процент пика 3, выявленный при помощи HIC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта при хранении в криососуде из нержавеющей стали в примере 4.

На фиг. 5 показан процент LMW, выявленный при помощи dSEC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта при хранении в криососуде из нержавеющей стали в примере 4.

На фиг. 6 показан процент пика В, выявленный при помощи SEC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта при хранении в криососуде из нержавеющей стали в примере 4.

На фиг. 7 показан процент пика В, выявленный при помощи SEC, проведенной с целью анализа стабильности этанерцепта при замораживании-оттаивании в примере 4.

На фиг. 8 показана стабильность показателя pH кондиционированного промежуточного пула AEX при контролируемой комнатной температуре (CRT) в анализе в примере 6.

На фиг. 9 показана стабильность показателя pH (А) и проводимости (В) пула UF/DF при CRT в анализе из примера 6.

На фиг. 10 показана стабильность этанерцепта, составленного в растворе SAS, в отношении показателя pH (А) и проводимости (В) в анализе из примера 6.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем изобретении предусмотрены усовершенствованные фармацевтические композиции на основе этанерцепта. Используемое в данном документе выражение "фармацевтическая композиция", как подразумевается, относится к составу на основе полипептида, подходящему для инъекции и/или введения нуждающемуся в этом пациенту. Более конкретно, фармацевтическая композиция по существу является стерильной и не содержит каких-либо средств, которые являются чрезмерно токсичными или патогенными для реципиента. Этанерцепт представляет собой растворимую форму рецептора TNF p75, слитую с Fc-доменом человеческого IgG1 (TNFR:Fc). Коммерчески доступный этанерцепт известен под торговой маркой ENBREL® (Immunex Inc., Таузенд-Оукс, Калифорния). Этанерцепт получают с помощью технологии рекомбинантной ДНК в системе экспрессии клеток млекопитающих - яйчников китайского хомячка (CHO). Он состоит из 934 аминокислот и имеет среднюю молекулярную массу приблизительно 150 кДа (Physicians Desk Reference, 2002, Medical Economics Company Inc.). Полная последовательность, экспрессируемая в клетках CHO, представлена ниже. Однако следует понимать, что возможны несущественные модификации и делеции в этой последовательности (до 10%), которые могут использоваться в пределах объема настоящего изобретения.

1 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-  
 11 Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-Leu-  
 21 Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-  
 31 Cys-Cys-Ser-Lys-Cys-Ser-Pro-Gly-Gln-His-  
 41 Ala-Lys-Val-Phe-Cys-Thr-Lys-Thr-Ser-Asp-  
 51 Thr-Val-Cys-Asp-Ser-Cys-Glu-Asp-Ser-Thr-  
 61 Tyr-Thr-Gln-Leu-Trp-Asn-Trp-Val-Pro-Glu-  
 71 Cys-Leu-Ser-Cys-Gly-Ser-Arg-Cys-Ser-Ser-  
 81 Asp-Gln-Val-Glu-Thr-Gln-Ala-Cys-Thr-Arg-  
 91 Glu-Gln-Asn-Arg-Ile-Cys-Thr-Cys-Arg-Pro-  
 101 Gly-Trp-Tyr-Cys-Ala-Leu-Ser-Lys-Gln-Glu-  
 111 Gly-Cys-Arg-Leu-Cys-Ala-Pro-Leu-Arg-Lys-  
 121 Cys-Arg-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Arg-Pro-  
 131 Gly-Thr-Glu-Thr-Ser-Asp-Val-Val-Cys-Lys-  
 141 Pro-Cys-Ala-Pro-Gly-Thr-Phe-Ser-Asn-Thr-  
 151 Thr-Ser-Ser-Thr-Asp-Ile-Cys-Arg-Pro-His-  
 161 Gln-Ile-Cys-Asn-Val-Val-Ala-Ile-Pro-Gly-  
 171 Asn-Ala-Ser-Met-Asp-Ala-Val-Cys-Thr-Ser-  
 181 Thr-Ser-Pro-Thr-Arg-Ser-Met-Ala-Pro-Gly-  
 191 Ala-Val-His-Leu-Pro-Gln-Pro-Val-Ser-Thr-  
 201 Arg-Ser-Gln-His-Thr-Gln-Pro-Thr-Pro-Glu-  
 211 Pro-Ser-Thr-Ala-Pro-Ser-Thr-Ser-Phe-Leu-  
 221 Leu-Pro-Met-Gly-Pro-Ser-Pro-Pro-Ala-Glu-  
 231 Gly-Ser-Thr-Gly-Asp-Glu-Pro-Lys-Ser-Cys-  
 241 Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Pro-Pro-Cys-Pro-  
 251 Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser-Val-  
 261 Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro-Lys-Asp-Thr-  
 271 Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr-Pro-Glu-Val-Thr-  
 281 Cys-Val-Val-Val-Asp-Val-Ser-His-Glu-Asp-  
 291 Pro-Glu-Val-Lys-Phe-Asn-Trp-Tyr-Val-Asp-  
 301 Gly-Val-Glu-Val-His-Asn-Ala-Lys-Thr-Lys-  
 311 Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Tyr-Asn-Ser-Thr-Tyr-  
 321 Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu-Thr-Val-Leu-His-  
 331 Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-  
 341 Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ala-  
 351 Pro-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile-Ser-Lys-Ala-Lys-  
 361 Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro-Gln-Val-Tyr-Thr-  
 371 Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Glu-Glu-Met-Thr-Lys-  
 381 Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu-Val-Lys-  
 391 Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp-Ile-Ala-Val-Glu-  
 401 Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln-Pro-Glu-Asn-Asn-  
 411 Tyr-Lys-Thr-Thr-Pro-Pro-Val-Leu-Asp-Ser-  
 421 Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu-  
 431 Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Gln-Gly-  
 441 Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser-Val-Met-His-Glu-  
 451 Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-  
 461 Leu-Ser-Leu-Ser-Pro-Gly-Lys

В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая этанерцепт, но по существу не содержащая дополнительное буферное средство. Выражение "дополнительное буферное средство" относится к компоненту композиции или состава на основе этанерцепта, отличному от собственно этанерцепта, который вносит значительный вклад в буферную емкость композиции или состава. Было показано, что собственно этанерцепт обеспечивает всю необходимую буферную активность для поддержания показателя pH в диапазоне от 6,1 до 6,5 и, в частности, приблизительно 6,2-6,3 в условиях, описанных ниже. Как продемонстрировано ниже в примере 1, было показано, что этот диапазон pH эффективен для поддержания требуемых характеристик стабильности состава на основе этанерцепта (менее 6% высокомолекулярных агрегатов и менее 28% частиц с неправильной укладкой и усеченных соединений).

Выражение "по существу не содержит дополнительное буферное средство" означает, что в нем содержится менее 0,5 мМ любого буферного средства, помимо этанерцепта.

Выражение "общее дополнительное буферное средство" в совокупности относится ко всем компонентам композиции или состава на основе этанерцепта, за исключением самого этанерцепта, которые вносят значительный вклад в буферную емкость композиции или состава.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат менее 2,0 мМ общего дополнительного буферного средства, менее 1,5 мМ общего дополнительного буферного средства, менее 1,0 мМ общего дополнительного буферного средства, менее 0,5 мМ общего дополнительного буферного средства, менее 0,25 мМ общего дополнительного буферного средства, менее 0,1 мМ общего дополнительного буферного средства или менее 0,05 мМ общего дополнительного буферного средства. В типичных фармацевтических композициях дополнительные буферные средства часто используют в концентрациях 5,0 мМ или выше для поддержания показателя pH в требуемом диапазоне. Различные хорошо известные дополнительные буферные средства представляют собой гистидин, фосфат калия, цитрат натрия или калия, малеиновую кислоту, ацетат аммония, трис-(гидроксиметил)аминометан (трис), различные формы ацетата и диэтаноламина. Одним из распространенных буферных средств является фосфат натрия, поскольку его буферная емкость находится при pH 6,2 или рядом. Фосфат натрия представляет собой буферное средство, используемое в современном коммерческом жидком составе на основе этанерцепта, поскольку его требуемый показатель pH составляет 6,3. В настоящем изобретении, описанном в данном документе, в фармацевтическом составе на основе этанерцепта фосфат натрия по существу отсутствует. Удивительно, что, несмотря на фактическое отсутствие какого-либо дополнительного буферного средства, показатель pH фармацевтической композиции по настоящему изобретению поддерживается в диапазоне от 6,1 до 6,5 даже после длительного хранения. Еще более удивительно то, что при введении субъектам (например, субъекту или человеку, являющемуся пациентом) фармацевтическая композиция по существу без дополнительного буферного средства вызывает значительно меньшие болевые ощущения, чем современный забуференный коммерческий состав. Хотя фосфат часто выбирают в качестве буфера для фармацевтических композиций из-за его буферной емкости, близкой к нейтральному показателю pH, и уверенности в том, что он является одним из наименее болезненных компонентов буфера (по сравнению, например, с цитратным буфером), авторы настоящего изобретения определили, что фосфатный буфер при показателе pH около 6,3 усиливает болевые ощущения при инъекции.

Если иное не ясно из контекста его применения, то "раствор для состава" или "буфер для состава" представляет собой раствор или буфер, который собственно не содержит этанерцепт, но используется для получения состава, содержащего этанерцепт.

Как правило, концентрация этанерцепта в фармацевтических композициях по настоящему изобретению составляет от приблизительно 40 до приблизительно 200 мг/мл в водном составе (в частности, вода в качестве растворителя). Более предпочтительно концентрация этанерцепта составляет от приблизительно 40 до приблизительно 100 мг/мл, еще более предпочтительно от приблизительно 40 до приблизительно 75 мг/мл и необязательно приблизительно 50 мг/мл.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также содержат аргинин. Было показано, что аргинин вносит значительный вклад в придание стабильности этанерцепту в жидком составе (см. патент США № 7648702, включенный в данный документ посредством ссылки). Фармацевтически подходящие формы аргинина являются коммерчески доступными. Как правило, L-аргинин (например, L-аргинина HCl или L-аргинин в форме основания) представляет собой аргинин, используемый для фармацевтических составов. Понятно, что в диапазоне pH от 6,0 до 6,6 и, в частности, при pH приблизительно 6,2-6,3 аргинин не вносит значительного вклада в придание буферной емкости составу. Таким образом, он не является дополнительным буферным средством в составах или композициях на основе этанерцепта по настоящему изобретению. Концентрация аргинина в композициях по настоящему изобретению предпочтительно составляет от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1 М, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 200 мМ или, альтернативно, от приблизительно 5 до приблизительно 100 мМ, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 100 мМ, еще более предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 75 мМ и еще более предпочтительно приблизительно 25 мМ. Таким образом, в одном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит от приблизительно 50 до 75 мг/мл этанерцепта и приблизительно 25 мМ аргинина, где фармацевтическая композиция по существу не содержит дополнительное буферное средство, а показатель pH композиции составляет от 6,0 до 6,6. Используемый в данном документе термин "приблизительно" следует понимать как означающий, что допускается изменение концентрации компонента описанного состава, которое может составлять до 10% от заданного значения и включать его. Например, если состав содержит приблизительно 10 мг/мл полипептида, это означает, что состав может содержать от 9 до 11 мг/мл заявленного полипептида.

Фармацевтические композиции могут содержать дополнительные вспомогательные вещества при условии, что эти вспомогательные вещества не являются дополнительными буферными средствами и, в частности, не являются фосфатными буферными средствами. Примеры дополнительных вспомогатель-

ных веществ по настоящему изобретению включают, без ограничения, сахара/полиолы, такие как сахароза, лактоза, глицерин, ксилит, сорбит, маннит, мальтоза, инозит, трегалоза, глюкоза; полимеры, такие как сывороточный альбумин (бычий сывороточный альбумин (BSA), человеческий SA или рекомбинантный HA), декстран, PVA, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), полиэтиленгликоль, желатин, поливинилпирролидон (PVP), гидроксипропилцеллюлоза (HEC); неводные растворители, такие как многоатомные спирты (например, PEG, этиленгликоль и глицерин), диметилсульфоксид (DMSO) и диметилформамид (DMF); аминокислоты, такие как пролин, L-серин, аланин, глицин, лизин гидрохлорид, саркозин и гамма-аминомасляная кислота, и поверхностно-активные вещества.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения вспомогательные вещества включают NaCl и/или сахарозу. NaCl может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации, составляющей от приблизительно 5 до приблизительно 200 мМ, более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 150 мМ, еще более предпочтительно от приблизительно 80 до приблизительно 140 мМ. Сахарозу можно добавить до концентрации, составляющей от приблизительно 0,5 до приблизительно 2% (вес./об.) сахарозы, более предпочтительно от приблизительно 0,8 до приблизительно 1,2% (вес./об.) сахарозы, еще более предпочтительно приблизительно 1% (вес./об.) сахарозы.

Осмоляльность фармацевтической композиции предпочтительно регулируют для того, чтобы довести до максимума стабильность активного ингредиента, а также чтобы минимизировать ощущения дискомфорта у пациента при введении. Обычно предпочтительно, чтобы фармацевтическая композиция была изотонична сыворотке крови, т.е. имела такую же или аналогичную осмоляльность, которая достигается за счет добавления модификатора тоничности. Сыворотка крови характеризуется осмоляльностью, составляющей приблизительно  $300 \pm 50$  мОсм/кг, поэтому предполагается, что осмоляльность изотонической фармацевтической композиции будет составлять от приблизительно 180 до приблизительно 420 мОсм. В некоторых вариантах осуществления диапазон будет составлять от приблизительно 250 до приблизительно 350 мОсм.

Под модификатором тоничности понимается молекула, которая вносит вклад в обеспечение осмоляльности раствора. Примеры модификаторов тоничности, подходящих для модификации осмоляльности, включают, без ограничения, аминокислоты (например, аргинин, цистеин, гистидин и глицин), соли (например, хлорид натрия, хлорид калия и цитрат натрия) и/или сахараиды (например, сахарозу, глюкозу и маннит). Концентрация модификатора тоничности в составе предпочтительно составляет от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1 М, более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 200 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрации NaCl и сахарозы регулируют для получения фармацевтической композиции, которая является изотонической. В некоторых вариантах осуществления, проиллюстрированных ниже в качестве примера, фармацевтическая композиция содержит приблизительно 40-100 мг/мл этанерцепта, приблизительно 120 мМ NaCl, приблизительно 25 мМ аргинина, приблизительно 1% сахарозы и воду. В частности, фармацевтическая композиция может по существу состоять из приблизительно 50-100 мг/мл этанерцепта, приблизительно 120 мМ NaCl, приблизительно 25 мМ аргинина, приблизительно 1% сахарозы, приблизительно 0,01% полисорбата 20 и воды.

Необязательно, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества представляют собой средства, которые уменьшают напряжение на границе раздела раствор/поверхность. Примерами поверхностно-активных веществ являются полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 и полисорбат 80 (например, TWEEN-20® (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) или TWEEN-80® (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури)), додецилсульфат натрия (SDS), полиоксипропиленовый сополимер, поллоксамеры, такие как поллоксамер 188 (например, PLURONIC® F-68 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури) или поллоксамер 407 (например, PLURONIC® F-127 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури)), CHAPS, монолаурат или любая комбинация вышеперечисленных. Предпочтительным поверхностно-активным веществом является полисорбат 20. Например, полисорбат 20 можно включить в фармацевтические композиции в концентрации (вес./об.), составляющей от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,03%. В конкретных вариантах осуществления, проиллюстрированных ниже в качестве примера, полисорбат 20 можно включить в фармацевтические составы в концентрации (вес./об.), составляющей 0,01% или приблизительно 0,004%.

Тестирование фармацевтических композиций.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют, как специалист в данной области может определить, способен ли состав поддерживать показатель pH в требуемом диапазоне. В сущности фармацевтическую композицию составляют и хранят в контейнерах для тестирования (которые могут быть стеклянными флаконами, стеклянными шприцами, пластиковыми шприцами, сосудах из нержавеющей стали или любого рода стерильным устройством, подходящим для фармацевтических композиций), и pH определяют в момент времени 0, а затем в указанные моменты времени в зависимости от обстоятельств. Обычно условия тестирования предполагают необходимость хранения фармацевтической композиции, и эти условия особенно акцентируются. Например, составы по настоящему изобретению способны поддерживать требуемый pH при контролируемой комнатной температуре (CRT) в течение по меньшей мере

2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель и по меньшей мере 24 недель. CRT определена согласно USP (Фармакопее США) и имеет температуру, поддерживаемую в термостате, которая охватывает обычную и общепринятую стандартную рабочую окружающую среду в диапазоне от 20 до 25°C (от 68 до 77°F); это дает среднюю рассчитанную кинетическую температуру не более 25°C и допускает амплитуду колебаний от 15 до 30°C (от 59 до 86°F), которые имеют место в аптеках, больницах и на складах.

В одном аспекте фармацевтические композиции по настоящему изобретению проявляют определенные качественные характеристики. Тестирование этих качественных характеристик также описано в качестве примера ниже. Например, фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат менее 6% от общего этанерцепта, агрегированного в высокомолекулярной форме, что определено с использованием эксклюзионной хроматографии. В качестве другого примера фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат менее 28% от общего количества этанерцепта в форме с неправильной укладкой, что определено с использованием хроматографии гидрофобного взаимодействия.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению способны оставаться стабильными за счет поддержания показателя pH и/или других указанных качественных характеристик (минимум высокомолекулярных форм и минимум форм с неправильной укладкой) при следующих температурах и продолжительных периодах времени: (1) при -30°C (замороженные) в течение по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев и по меньшей мере 36 месяцев; (2) в течение 1 цикла замораживания/оттаивания, до 2 циклов замораживания/оттаивания, до 3 циклов замораживания/оттаивания и до 5 циклов замораживания/оттаивания; (3) при 4°C (температуре в холодильнике) в течение по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 24 недель и по меньшей мере 52 недель; (4) при 25°C (комнатной температуре) в течение по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 24 недель; и (5) при 40°C (ускоренное тестирование стабильности) в течение по меньшей мере 2 недель.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также демонстрируют неожиданный результат в уменьшении болевых ощущений при инъекции субъекту. Это свойство можно оценить с использованием визуальной аналоговой шкалы (VAS), которая была обоснована Gallagher et al., 2002, *Am. J. Em. Med.* V. 20; i4:287-290. Обученные медицинские работники вводят лекарственное средство путем инъекции и в течение 30 с после каждой инъекции субъекты оценивают свой уровень болевых ощущений при инъекции с использованием 100 мм визуальной аналоговой шкалы (VAS). Разница от 13 до 16 мм согласно VAS считается клинически значимой. С использованием этой методики было продемонстрировано, что плацебо-состав без фосфата вызывал значительно меньшие болевые ощущения, чем плацебо-состав, содержащий фосфат при pH 6,3, и современный коммерческий состав, содержащий этанерцепт, и фосфат при pH 6,3.

Получение и очистку этанерцепта для использования в фармацевтических композициях и способах по настоящему изобретению можно выполнить любым стандартным способом. Как правило, этанерцепт рекомбинантно экспрессируется в клетках CHO и секретируется в среду. Среду собирают, фильтруют и очищают с использованием, например, различных хроматографических методик. Например, белок А можно использовать для очистки полипептидов, содержащих Fc-домен, таких как этанерцепт, и он предпочтителен в качестве первой стадии обработки. Другими методиками очистки полипептидов являются фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (как, например, колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ и аффинная хроматография и любая комбинация методик очистки, известных или еще не разработанных. Примеры применимых методик получения и очистки можно найти в патентах США № 7294481 (Fung), 7452695 (Van Ness et al.), 7122641 (Vedantham et al.), 7157557 (Sassenfeld et al.), 7300773 (Drapeau et al.), 8163522 (Brockhaus et al.) и 7648702 (Gombotz et al.).

Способы по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ составления фармацевтической композиции на основе этанерцепта с удалением буфера и поддержанием показателя pH в целевом диапазоне, предусматривающий составление этанерцепта в забуференном составе в этом целевом диапазоне и замену забуференного состава против незабуференного состава, который находится в пределах или несколько ниже этого целевого диапазона, и сбор полученного фармацевтического состава на основе этанерцепта. В предпочтительном варианте осуществления, проиллюстрированном в качестве примера ниже, способ предусматривает составление фармацевтической композиции на основе этанерцепта с удалением буфера и поддержанием pH в диапазоне от 6,0 до 6,6, предусматривая составление состава на основе этанерцепта в забуференном составе при показателе pH от 6,0 до 6,6, замену забуференного состава против незабуференного состава с показателем pH от 5,6 до 6,5 и сбор полученного фармацевтического состава. Чтобы получить незабуференную композицию на основе этанерцепта, которая поддерживает показатель pH в



диапазоне от 6,1 до 6,5, важно обеспечить точное определение показателя pH как исходного забуференного состава на основе этанерцепта, так и незабуференного состава. Например, если показатель pH исходного забуференного состава на основе этанерцепта составляет 7,2, тогда его необходимо скорректировать с помощью сильной кислоты, такой как HCl, до диапазона от 6,1 до 6,5. Точно так же незабуференный состав, который используют для замены, должен титроваться до показателя pH в диапазоне от 5,6 до 6,5. Поскольку незабуференный состав, используемый для замены, не содержит буферное средство, следует соблюдать осторожность при титровании.

Чтобы осуществить замену забуференного состава против незабуференного состава, специалист в данной области техники может применить различные методики замены буфера, которые хорошо известны в данной области техники. При диализе используют селективную диффузию через полупроницаемую мембрану для удаления нежелательных малых молекул из состава более крупных белков. В одном варианте осуществления уравнивания проводят последовательно до тех пор, пока не будет достигнута необходимая кратность снижения концентрации нежелательной молекулы. Например, три последовательных уравнивания, каждое при 100-кратном разведении или выше, можно использовать для достижения снижения концентрации в 1000000 раз или выше. Ультрафильтрация и диализ похожи на диализ в том аспекте, что в них используют полупроницаемую мембрану. Но в отличие от пассивной диффузии при диализе, ультрафильтрация и диализ включают подачу растворов через мембрану под давлением с применением различных методик. Как правило, используют давление и центрифугирование. Еще один способ замены буфера можно выполнить с использованием гель-фильтрации или эксклюзионной хроматографии. Существует много других хроматографических методик, которые также можно использовать для осуществления замены буфера, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, такие как ионообменная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия и хроматография в смешанном режиме.

После того как забуференный состав заменяют на незабуференный состав, способы по настоящему изобретению включают сбор полученного фармацевтического состава. На этой стадии по существу весь буфер был удален, но показатель pH по-прежнему поддерживается на требуемых уровнях. В случае фармацевтической композиции, содержащей этанерцепт, показатель pH поддерживается в диапазоне от 6,0 до 6,6.

При необходимости фармацевтический состав можно дополнительно обработать. Например, можно добавить поверхностно-активное вещество. В другом примере, если требуется удалить частицы, тогда фармацевтическую композицию можно отфильтровать. Альтернативно или дополнительно, способы по настоящему изобретению также включают разделение фармацевтических композиций на аликвоты в виде готовой лекарственной формы. Такие готовые лекарственные формы распространяются для конечного использования пациентами или поставщиками медицинских услуг. Фармацевтические композиции по данному изобретению особенно применимы для парентерального введения, т.е. подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, интрацеребрально, интраартикулярно, интрасиновиально и/или интратекально. Парентеральное введение можно осуществлять посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы, например в ампулах или в многодозовых контейнерах. Фармацевтические композиции, если это требуется, могут быть представлены во флаконе, упаковке или дозирующем устройстве, которое может содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном варианте осуществления дозирующее устройство может содержать шприц с однократной дозой жидкого состава, готового для инъекции. В другом варианте осуществления фармацевтическую композицию разделяют на аликвоты в кассетный компонент для применения с шприц-ручкой для многократного использования. В еще одном аспекте настоящего изобретения фармацевтические композиции могут быть предоставлены упакованными в натальное устройство для инъекций или вместе с ним. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции могут быть разделены на аликвоты в виде готовой лекарственной формы, подходящей для безыгольного инъектора.

Фармацевтическую композицию также можно разделить на аликвоты в формате, подходящем в качестве депо-препарата. Такие составы длительного действия можно вводить путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или путем внутримышечной инъекции. Так, например, составы можно модифицировать с помощью подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол или в виде умеренно растворимых производных, например в виде умеренно растворимой соли.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на набор или контейнер, который содержит фармацевтическую композицию по настоящему изобретению. Вместе с набором также могут поставляться инструкции по хранению и применению фармацевтических композиций. Контейнер может быть, например, контейнером однократного применения, т.е. контейнером, который содержит однократную дозу состава по настоящему изобретению. Понятно, что контейнер однократного применения может содержать однократную дозу и достаточное дополнительное количество, чтобы гарантировать возможность введения пациенту полной однократной дозы из контейнера, но не настолько большое до-

полнительное количество, чтобы этот контейнер можно было использовать для введения второй дозы. Примеры контейнеров, подходящих для применения в определенных аспектах настоящего изобретения (будь то контейнеры одноразового или многоразового применения), включают флаконы, шприцы и шприц-ручки. Примеры подходящих шприц-ручек включают те, которые описаны в патентах США № 8177749, 8052645 и 8920374, в заявках на патент США с порядковыми № 12/993163, 13/269750, 13/454531, 14/112479, 14/777255 и 14/777259 и в публикациях согласно РСТ WO 2014/0089393, WO 2016/033496 и WO 2016/033507, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Композиции и составы, содержащие этанерцепт, по настоящему изобретению, а также шприцы, шприц-ручки, наборы и им подобные, описанные в данном документе, можно использовать в лечении пациентов с состояниями, которые отвечают на лечение этанерцептом. Примеры таких состояний включают ревматоидный артрит, псориазический артрит, анкилозирующий спондилит и псориаз. Способы лечения пациентов с применением этанерцепта описаны, например, в патентах США № 7915225, 8119605, 8410060, 8722631 и 8119604, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение будет более полно понято при ссылке на следующие примеры. Однако примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

### Примеры

Пример 1. Тестирование стабильности различных составов.

В этом примере продемонстрировано влияние показателя pH и буфера на этанерцепт при концентрации 50 мг/мл, при этом оценивали стабильность высококонцентрированного (100 мг/мл) раствора без добавления фосфатного буфера. Тестировали следующие составы.

Таблица 1

Составы для скрининга по показателю pH

| Название состава | Буфер               | Вспомогательные вещества                                         | Добавленный полисорбат | Конечный показатель pH | Конц. белка (мг/мл) |
|------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| A45SuT           | 10 mM ацетат натрия | 9% сахароза                                                      | 0,004% PS20            | 4,5                    | 50                  |
| A52SuT           | 10 mM ацетат натрия | 9% сахароза                                                      | 0,004% PS20            | 5,2                    | 50                  |
| A58SuT           | 10 mM ацетат натрия | 9% сахароза                                                      | 0,004% PS20            | 5,8                    | 50                  |
| 50_SAST_100NaCl  | отсутствует         | 25 mM L-аргинин, 100 mM NaCl, 1% сахароза                        | 0,004% PS20            | 6,3                    | 50                  |
| 100_SAST_100NaCl | отсутствует         | 25 mM L-аргинин, 100 mM NaCl, 1% сахароза                        | 0,004% PS20            | 6,3                    | 100                 |
| PASST+BeOH       | 25 mM фосфат        | 25 mM L-аргинин, 100 mM NaCl, 1% сахароза, 0,9% бензиловый спирт | 0,004% PS20            | 6,3                    | 50                  |
| PASST (контроль) | 25 mM фосфат        | 25 mM L-аргинин, 100 mM NaCl, 1% сахароза                        | 0,004% PS20            | 6,3                    | 50                  |

Материалы: в данном исследовании использовали лекарственное вещество Enbrel в PASS (25 mM фосфатного буфера, 25 mM L-аргинина, 100 mM NaCl, 1% сахарозы) при концентрации 50 мг/мл. В случае состава с ацетатом и без буфера материал подвергали диализу с получением новых составов (без полисорбата) и осуществляли концентрирование до 50 мг/мл, используя центрифужные пробирки с мембранным фильтром Centriprep MWCO 10000. Образец 50\_SAS\_100NaCl также концентрировали до 100 мг/мл (100\_SAS\_100NaCl). Бензиловый спирт вносили в точном количестве в современный состав до

конечной концентрации 0,9%. 1% исходный раствор полисорбата 20 готовили свежим и вносили в точном количестве во все составы до конечной концентрации 0,004%. Всеми составами вручную заполняли стеклянные шприцы BD на 1 мл до объема 0,5 мл, а затем закрывали пробкой с помощью вакуумного укупорочного устройства ASPU.

Способы: показатель pH измеряли с использованием pH-метра Mettler Toledo SevenEasy в сочетании с Mettler InLab MicroProbe. Перед измерениями образцы нагревали до комнатной температуры. Осмоляльность измеряли с использованием Advanced Osmometer Model 3900. Каждое измерение выполняли с использованием 250 мкл образца и стандарты осмоляльности 290 мОсм тестировали для обеспечения надлежащей работы системы. Эксклюзионную HPLC проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2. Эксклюзионную HPLC с денатурацией проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2.

Результаты: показатель pH для всех составов поддерживался в течение 24 недель.

Таблица 2

Показатель pH в указанные моменты времени и  
при указанных температурах

|                  | Показатель pH |                |
|------------------|---------------|----------------|
|                  | t=0           | t=24 нед.      |
| Образец          | 4°C           | 4°C 25°C 40°C  |
| A45SuT           | 4,60          | 4,66 4,66 4,61 |
| A52SuT           | 5,10          | 5,13 5,16 5,08 |
| A58SuT           | 5,61          | 5,60 5,66 5,62 |
| 50_SAST_100NaCl  | 6,24          | 6,21 6,22 6,17 |
| 100_SAST_100NaCl | 6,32          | 6,21 6,20 6,19 |
| PASST+BeOH       | 6,27          | 6,22 6,22 6,21 |
| PASST контроль   | 6,26          | 6,21 6,21 6,19 |

Таблица 3

Уровни агрегации (пик В), полученные при помощи SEC,  
% от общего количества, при 4°C

| Образец          | t=0 | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 0,9 | 1,1      | 1,1      | 1,2       | 1,2       |
| A52SuT           | 1,2 | 1,4      | 1,5      | 1,6       | 1,4       |
| A58SuT           | 1,0 | 1,2      | 1,2      | 1,3       | 1,3       |
| 50_SAST_100NaCl  | 1,1 | 1,3      | 1,3      | 1,3       | 1,4       |
| 100_SAST_100NaCl | 1,1 | 1,4      | 1,5      | 1,5       | 1,6       |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 1,2      | 1,2      | 1,3       | 1,3       |
| PASST-контроль   | 1,0 | 1,1      | 1,2      | 1,2       | 1,3       |

Таблица 4

Уровни агрегации (пик В), полученные при помощи SEC,  
% от общего количества, при 25°C

| Образец          | t=0 | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 0,9 | 2,0      | 2,7      | 3,2       | 4,1       |
| A52SuT           | 1,2 | 2,7      | 3,1      | 3,6       | 4,6       |
| A58SuT           | 1,0 | 1,9      | 2,6      | 3,1       | 4,4       |
| 50_SAST_100NaCl  | 1,1 | 1,9      | 2,4      | 2,8       | 3,7       |
| 100_SAST_100NaCl | 1,1 | 2,6      | 3,3      | 3,9       | 5,3       |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 1,9      | 2,4      | 2,8       | 3,8       |
| PASST-контроль   | 1,0 | 1,8      | 2,2      | 2,6       | 3,5       |

Таблица 5

Уровни агрегации (пик В), полученные при помощи SEC,  
% от общего количества, при 40°C

| Образец          | t=0 | t=2 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 0,9 | 5,6      | 9,0      | 11,9     | 11,9      | 9,6       |
| A52SuT           | 1,2 | 6,3      | 12,9     | 13,6     | 16,4      | 17,9      |
| A58SuT           | 1,0 | 5,1      | 9,1      | 14,7     | 18,4      | 24,5      |
| 50_SAST_100NaCl  | 1,1 | 3,9      | 6,8      | 12,1     | 16,0      | 26,0      |
| 100_SAST_100NaCl | 1,1 | 5,9      | 10,8     | 18,5     | 24,0      | 37,8      |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 6,3      | 12,0     | 21,4     | 28,1      | 45,5      |
| PASST-контроль   | 1,0 | 4,0      | 6,9      | 12,1     | 16,1      | 26,7      |

Таблица 6  
Низкомолекулярные соединения (усеченные согласно анализу dSEC)  
при 4°C

| Образец          | t=0 | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 1,6 | 1,3      | 1,4      | 2,3       | 2,5       |
| A52SuT           | 1,2 | 1,6      | 1,3      | 1,7       | 1,7       |
| A58SuT           | 1,4 | 1,7      | 1,5      | 1,4       | 1,4       |
| 50_SAST_100NaCl  | 0,9 | 1,5      | 1,4      | 1,4       | 1,5       |
| 100_SAST_100NaCl | 1,0 | 1,5      | 1,7      | 2,0       | 2,6       |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 1,5      | 1,2      | 1,4       | 1,3       |
| PASST-контроль   | 1,2 | 1,4      | 1,4      | 1,7       | 1,6       |

Таблица 7  
Низкомолекулярные соединения (усеченные согласно анализу dSEC)  
при 25°C

| Образец          | t=0 | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 1,6 | 3,6      | 5,9      | 8,4       | 13,1      |
| A52SuT           | 1,2 | 2,9      | 2,9      | 5,8       | 9,2       |
| A58SuT           | 1,4 | 2,2      | 2,8      | 4,0       | 5,7       |
| 50_SAST_100NaCl  | 0,9 | 2,2      | 2,4      | 2,9       | 4,7       |
| 100_SAST_100NaCl | 1,0 | 2,9      | 3,2      | 4,4       | 6,9       |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 2,2      | 2,2      | 3,3       | 4,4       |
| PASST-контроль   | 1,2 | 1,6      | 2,1      | 3,2       | 4,8       |

Таблица 8  
Низкомолекулярные соединения (усеченные согласно анализу dSEC)  
при 40°C

| Образец          | t=0 | t=2 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------------|-----|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| A45SuT           | 1,6 | 9,7      | 16,7     | 28,3     | 38,1      | 55,0      |
| A52SuT           | 1,2 | 6,0      | 11,3     | 18,6     | 26,0      | 39,6      |
| A58SuT           | 1,4 | 4,0      | 7,7      | 12,2     | 18,2      | 27,5      |
| 50_SAST_100NaCl  | 0,9 | 3,6      | 5,9      | 8,6      | 12,8      | 18,7      |
| 100_SAST_100NaCl | 1,0 | 3,5      | 5,7      | 9,6      | 12,9      | 19,4      |
| PASST+BeOH       | 1,0 | 3,6      | 5,8      | 9,8      | 13,2      | 20,5      |
| PASST-контроль   | 1,2 | 3,3      | 5,9      | 10,0     | 12,8      | 20,2      |

Заключение: в ходе длительного хранения при 25 и 40°C составы с более низким показателем pH - A45SuT, A52SuT и A58SuT - проявляли наличие нежелательных уровней деградировавших низкомолекулярных соединений или усеченных соединений при анализе с использованием эксклюзионной хроматографии с денатурацией. Высококонцентрированный состав 100\_SAST\_100NaCl, хранившийся при 25 и 40°C, начал демонстрировать увеличение количества высокомолекулярных агрегатов при анализе с использованием эксклюзионной хроматографии, но при 4°C вел себя аналогично современному коммерческому составу. PASST+BeOH (который представляет собой современный коммерческий состав, модифицированный путем добавления 0,004% полисорбата 20 и 0,9% бензилового спирта) вел себя аналогично современному коммерческому составу как при 4°C, так и при 25°C, но проявлял повышение количества высокомолекулярных соединений согласно SE-HPLC в более поздние моменты времени в ходе хранения при повышенной температуре 40°C. Однако состав 50\_SAST\_100NaCl поддерживал уровни высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений, которые были сопоставимы с современным коммерческим составом при всех температурах, даже в отсутствие фосфатного буфера.

Пример 2. Исследование болевых ощущений.

Это исследование проводили по схеме одноцентрового, рандомизированного, одностороннего слепого, перекрестного исследования, в котором 48 здоровых мужчин и женщин получали однократную SC-инъекцию 6 растворов.

Тестируемые составы (подробности ниже в табл. 9) вводил обученный медицинский работник в 6 индивидуальных последовательностях 8 субъектам, рандомизированным для каждой последовательности. Инъекции вводили в каждый квадрант передней брюшной стенки с интервалом приблизительно 1 ч. В течение 30 с после каждой инъекции субъекты оценивали свой уровень болевых ощущений, обусловленных инъекцией, с использованием 100 мм визуальной аналоговой шкалы (VAS). Нежелательные явления собирали от начала первой инъекции на протяжении 30 дней после первой инъекции. Телефонные звонки для последующего наблюдения по оценке безопасности проводили в день 2 (через 24 ч после шестой инъекции) и день 31 ( $\pm 2$  дня).

Таблица 9

| Тестируемые составы |                                                     |       |                                                                                                                                                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Раствор             | Описание                                            | Объем | Композиция                                                                                                                                                      |
| А.                  | Отрицательный контроль болевых ощущений             | 1,0   | 10 мМ ацетата натрия, 9% (вес/объем) сахарозы, 0,004% (вес/объем) полисорбата 20, показатель pH 5,2                                                             |
| В.                  | Коммерческий плацебо-состав                         | 0,098 | 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ хлорида натрия, 1,0% (вес/объем) сахарозы, показатель pH 6,3                                                     |
| С.                  | Коммерческий плацебо-состав с бензиловым спиртом    | 1,0   | 100 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ L-аргинина, 1,0% (вес/объем) сахарозы, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20, 0,9% (вес/объем) бензилового спирта |
| Д.                  | Тестируемый состав без фосфата натрия               | 1,0   | 100 мМ хлорида натрия, 25 мМ L-аргинина, 1,0% (вес/объем) сахарозы, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20                                                            |
| Е.                  | Тестируемый состав без                              | 0,51  | 100 мМ хлорида натрия, 25 мМ L-аргинина, 1,0% (вес/объем)                                                                                                       |
|                     | фосфата натрия                                      |       | сахарозы, 0,01% (вес/объем) полисорбата 20                                                                                                                      |
| Ф.                  | Коммерческий состав на основе этанерцепта, 50 мг/мл | 0,98  | 50 мг/мл этанерцепта в растворе, состоящем из 100 мМ хлорида натрия, 25 мМ фосфата натрия, 25 мМ L-аргинина, 1% сахарозы, pH 6,3                                |

Статистические методы: все анализы проводили с популяцией для анализа безопасности, которая состояла из всех субъектов, получивших по меньшей мере один раствор. Чтобы обеспечить 93,4% мощности для выявления разницы в 15 мм между растворами ( $\alpha=0,05$ , двусторонний), выбрали размер выборки из 48 субъектов (по 8 на последовательность). Отличие от 13 до 16 мм на VAS считается клинически значимым (Gallagher et al., 2002, Am. J. Em. Med. V. 20; i4:287-290).

Сводные статистические данные (среднее значение, стандартное отклонение [SD], стандартную погрешность [SE], медиану, минимум, максимум) рассчитали для оценок VAS в баллах на раствор. Оценки VAS в баллах анализировали с использованием модели дисперсионного анализа (ANOVA), которая включала последовательность, раствор и период в качестве независимых переменных, а субъекта в последовательности - как случайный эффект. Для множественных сравнений не вносили никаких поправок.

Получали показатели средней разности оценок VAS в баллах для первичных и вторичных сравнений, соответствующие 95% доверительные интервалы (95% CI) и р-значения.

Таблица 10

| Краткое описание оценок VAS в баллах |           |           |           |           |           |           |
|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Непосредственно после инъекции       | Раствор А | Раствор В | Раствор С | Раствор D | Раствор Е | Раствор F |
| N                                    | 48        | 48        | 48        | 48        | 48        | 48        |
| Среднее                              | 19,6      | 53,6      | 28,7      | 29,8      | 29,6      | 53,4      |
| SD                                   | 18,0      | 27,9      | 23,5      | 26,4      | 24,3      | 32,4      |
| SE                                   | 2,6       | 4,0       | 3,4       | 3,8       | 3,5       | 4,7       |
| Медиана                              | 13,0      | 59,0      | 24,0      | 21,5      | 21,0      | 49,0      |

|                      |       |       |       |       |       |        |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Минимум,<br>максимум | 0, 66 | 1, 98 | 1, 99 | 0, 94 | 1, 86 | 2, 100 |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|

Закключение: как у раствора С (представляющего собой плацебо с бензиловым спиртом, не являющегося специфичным для продукта), так и у раствора D (представляющего собой плацебо без фосфата натрия, не являющегося специфичным для продукта) средние оценки VAS в баллах были значительно ниже, чем у раствора В (плацебо для этанерцепта;  $p < 0,001$ ), что указывает на относительно более слабое болевое ощущение в месте инъекции с этими двумя растворами. Никаких существенных отличий в средних значениях оценок VAS в баллах не выявили между растворами С и D, между раствором В (плацебо этанерцепта) и раствором F (состав с активным компонентом в виде этанерцепта) или между различными объемами инъекций (0,51 и 1,0 мл). Раствор А (отрицательный контроль в исследовании болевых ощущений) ассоциировался с наименьшими болевыми ощущениями по сравнению со всеми остальными растворами. У семерых субъектов имелись одно или несколько нежелательных явлений. Все нежелательные явления представляли собой СТСАЕ степени 1, т.е. представляли собой реакции в месте инъекции, не являющиеся серьезными.

Пример 3. Тестирование долговременной стабильности кандидатных составов.

Долговременное исследование проводили для контроля стабильности этанерцепта в нескольких новых кандидатных составах при 50 мг/мл. Стабильность оценивали при заполнении 1 мл в шприцах объемом 1 мл с несъемной стеклянной иглой с использованием SE-HPLC, HIC HPLC, dSEC HPLC и оценки наличия взвешенных частиц (НЛАС) после хранения при 4, 25 и 40°C. Осмоляльность и концентрацию белка тестировали только в момент времени ноль, а показатель pH тестировали в момент времени ноль и после 12 недель хранения, чтобы подтвердить отсутствие смещения показателя pH. Результаты исследования показали, что тестируемые составы оставались аналогичными современному коммерческому составу после 12 недель хранения при повышенной температуре 40°C, а также после 24 недель хранения при рекомендуемой температуре хранения 2-8°C и при повышенной температуре 25°C.

Таблица 11

Параметры состава при 50 мг/мл этанерцепта

| Название состава | Буфер         | Другие вспомогательные вещества                                   | Показатель pH |
|------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|---------------|
| PASST (контроль) | 25 мМ фосфата | 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20 | 6,3           |
| SAST_100NaCl     | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20 | 6,3           |
| SAST_120NaCl     | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20 | 6,3           |

Материалы: в данном исследовании использовали лекарственное вещество Enbrel в PASS (25 мМ фосфатного буфера, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы) при концентрации 50 мг/мл. Материал подвергали диафильтрации в PASS и SAS\_100NaCl (25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы) при 50 мг/мл, а затем подвергали ультрафильтрации до ~75 мг/мл. Составы с концентрацией 50 мг/мл готовили путем разведения материала PASS и SAS после UF/DF соответствующим раствором. SAST\_120NaCl готовили путем разведения материала SAS с концентрацией 75 мг/мл с использованием концентрированного исходного раствора NaCl до достижения конечной концентрации 120 мМ NaCl. 1% исходный раствор полисорбата 20 готовили свежим и вносили во все составы до конечной концентрации 0,010%. Вручную всеми составами заполняли стеклянные 1 мл шприцы BD до объема 1 мл, а затем закрывали пробкой с помощью вакуумного укупорочного устройства ASPU.

Способы: показатель pH измеряли с использованием pH-метра Mettler Toledo SevenEasy в сочетании с Mettler InLab MicroProbe. Перед измерениями образцы нагревали до комнатной температуры. Измерения концентрации белка на основании абсорбции при 280 нм для всех образцов проводили при комнатной температуре с использованием системы DropSense96 UV/Vis Lab Chip DS. Каждый образец измеряли в чистом виде по меньшей мере в трех повторях (3 мкл каждый), включая холостую пробу для раствора для состава. Осмоляльность измеряли с использованием Advanced Osmometer Model 3900. Каждое измерение проводили с использованием 250 мкл образца и стандарты осмоляльности 290 мОсм тестировали для обеспечения надлежащей работы системы. Эксклюзионную HPLC проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2. HPLC гидрофобного взаимодействия проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2 с абсорбцией при 215 нм. Эксклюзионную HPLC с денатурацией проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2. Анализ невидимых невооруженным глазом частиц проводили с использованием системы

счетчика частиц HACH HIAC/Roeco, оснащенной лазером HRLD-150 и программным обеспечением Pharm Spec. Все образцы разводили буфером для составления PASS до 25 мг/мл. Образцы тщательно перемешивали, не закрывали и дегазировали в течение 2 ч при 75 торр перед анализом. Проводили анализ четырех проб по 1,0 мл каждая (без объема тары), с первой отброшенной пробой и усреднением оставшихся трех проб. Данные для размеров частиц 2, 5, 10 и 25 мкм собирали во все моменты времени. Результаты учитывают разведение и представлены как накопленная встречаемость на 1 мл.

Результаты и обсуждение: показатель pH для всех составов измеряли в момент времени ноль и через 12 недель хранения при всех температурах. Каких-либо тенденций к изменению в зависимости от времени или температуры хранения не выявили. Измеренные показатели pH для всех образцов можно найти в табл. 12. Не выявили смещения показателя pH после 52 недель хранения при 4°C, после 24 недель хранения при 25°C или после 12 недель хранения при 40°C; при этом все образцы соответствовали критериям приемлемости, составляющим  $\pm 0,2$  единицы pH от целевого показателя pH 6,3.

Таблица 12

| Измеренный показатель pH для образцов |      |           |           |           |
|---------------------------------------|------|-----------|-----------|-----------|
| Аббревиатура состава                  | t=0  | t=52 нед. | t=24 нед. | t=12 нед. |
|                                       |      | 4°C       | 25°C      | 40°C      |
| PASST                                 | 6,27 | 6,30      | 6,32      | 6,28      |
| SAST_100NaCl                          | 6,23 | 6,15      | 6,25      | 6,20      |
| SAST_120NaCl                          | 6,22 | 6,16      | 6,24      | 6,15      |

Концентрацию белка во всех составах тестировали в момент времени ноль. Результаты по концентрации белка для всех образцов можно представлены в табл. 13. Все образцы соответствовали критериям приемлемости.

Таблица 13

| Показатели концентрации белка |      |
|-------------------------------|------|
| Аббревиатура состава          | t=0  |
| PASST                         | 51,1 |
| SAST_100NaCl                  | 51,4 |
| SAST_120NaCl                  | 51,0 |

Осмоляльность тестировали только в момент времени ноль. Результаты по осмоляльности для всех образцов можно найти в табл. 14. Все составы имели свою целевую осмоляльность. Из-за различий в уровнях буфера и вспомогательных веществ не ожидалось, что осмоляльность будет одинаковой для разных составов.

Таблица 14

| Показатели осмоляльности |                  |               |
|--------------------------|------------------|---------------|
| Аббревиатура состава     | t=0 (измеренная) | теоретическая |
| PASST                    | 314              | 313           |
| SAST_100NaCl             | 262              | 263           |
| SAST_120NaCl             | 299              | 300           |

SE-HPLC проводили для контроля уровней агрегации в зависимости от параметров состава, времени и температуры. Пик В представляет собой количество образовавшихся высокомолекулярных соединений (агрегатов). Результаты показали отсутствие различий в пике В между PASST-контролем и составами без буфера при 4 и 25°C с небольшими отличиями, наблюдаемыми через 12 недель хранения при 40°C (фиг. 1). Пик В представляет общее количество агрегатов, выявленное при помощи SE-HPLC для этих составов. Все образцы оставались пригодными (пик В  $\leq 6\%$ ) после 52 недель хранения при 4°C, после 24 недель хранения при 25°C и после 12 недель хранения при 40°C.

SE-HPLC с денатурацией использовали для контроля наличия усеченных LMW соединений. Результаты показали аналогичные тенденции к изменению HMW частиц, основного пика, LMW между составами через 52 недели (фиг. 2).

Изменения в агрегатах с неправильной укладкой контролировали с помощью HIC HPLC. Результаты при всех тестируемых температурах не показали отличий в пике 3 между PASST-контролем и составами без буфера (фиг. 3). Все образцы оставались в допустимых диапазонах (пик 1  $\leq 5\%$ , пик 2  $\geq 70\%$ , пик 3  $\leq 28\%$ ) после 52 недель хранения при 4°C, после 24 недель хранения при 25°C и после 12 недель хранения при 40°C.

Невидимые невооруженным глазом частицы контролировали путем подсчета частиц в режиме светотени (HIAC). Результаты соответствовали накопленным данным PFS и были одинаковыми для всех составов при всех температурах через 12 недель. На основе этого набора данных нельзя установить какие-либо тенденции, поскольку в каждый момент времени использовали один флакон с содержимым трех объединенных шприцев, и при этом существует высокий уровень вариабельности между шприцами

в плане величины вклада капле силиконового масла.

Заключение: долговременную стабильность нескольких новых измененных кандидатных составов и современного коммерческого состава с добавлением полисорбата оценивали при 4, 25 и 40°C. С помощью анализов SE, dSEC или HIC HPLC, а также подсчета частиц в режиме светотени не выявили значительных отличий между составами после хранения в течение 52 недель при 4°C и 24 недель при 25°C; при этом с помощью анализов HPLC выявили незначительные отличия после 12 недель хранения при 40°C. Не выявили смещения показателя pH, и при этом все составы оставались в приемлемых диапазонах. Результаты исследования показали, что составы SAST\_120NaCl и SAST\_100NaCl при концентрации 50 мг/мл были стабильными и аналогичными современному коммерческому составу через 12 недель при рекомендуемой температуре хранения от 2 до 8°C.

Пример 4. Замораживание/оттаивание и долговременная стабильность лучших измененных кандидатных составов в контейнерах из нержавеющей стали.

Проводили исследование циклического замораживания/оттаивания для контроля стабильности этанерцепта в трех новых кандидатных составах при концентрации 50 мг/мл. Составы по сравнению с современным коммерческим составом PASS (25 мМ фосфатного буфера, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы) представляли собой SAST\_100NaCl (25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20) SAS\_120NaCl (25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы) и SAST\_120NaCl (25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20). Стабильность в отношении агрегации при циклическом изменении температуры от -30 до 4°C в криососудах из нержавеющей стали объемом 55 мл оценивали с помощью SE-HPLC на протяжении до пяти циклов замораживания/оттаивания включительно.

Кроме того, проводили долговременное исследование для контроля стабильности этанерцепта в новом кандидатном составе при концентрации 50 мг/мл. Состав по сравнению с современным коммерческим составом PASS (25 мМ фосфатного буфера, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы) представлял собой SAST\_120NaCl (25 мМ фосфатного буфера, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы, 0,010% полисорбата 20). Стабильность при хранении в криососудах из нержавеющей стали объемом 10 и 55 мл оценивали с использованием SE-HPLC, HIC HPLC, dSEC HPLC и оценки наличия взвешенных частиц (HAC). Температуры и время хранения составляли -30°C на срок до 36 месяцев и 4°C на срок до 12 месяцев. Результаты за 52 недели представлены в данном документе.

Результаты: показатели pH для всех составов оставались постоянными в момент времени 52 недели и в течение пяти циклов замораживания/оттаивания.

Таблица 15

Показатель pH, концентрация белка и осмоляльность

| Образец      | Конц.<br>(мг/мл) | Осмоляльность<br>(мОсм) | Показатель pH |                  |                 |
|--------------|------------------|-------------------------|---------------|------------------|-----------------|
|              |                  |                         | t=0           | 52 нед.,<br>30°C | 52 нед.,<br>4°C |
| PASS         | 49,5             | 304                     | 6,34          | 6,20             | 6,22            |
| SAST_120NaCl | 51,4             | 303                     | 6,27          | 6,19             | 6,20            |

Таблица 16

Показатели pH, концентрация белка и осмоляльность  
в течение циклов замораживания/оттаивания

| Образец      | Конц.<br>(мг/мл) | Осмоляльность<br>(мОсм) | Показатель pH             |                           |                           |
|--------------|------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|              |                  |                         | 0<br>замораж./<br>оттаив. | 3<br>замораж./<br>оттаив. | 5<br>замораж./<br>оттаив. |
| PASS         | 47,9             | 310                     | 6,30                      | 6,29                      | 6,27                      |
| SAST_100NaCl | 48,8             | 259                     | 6,19                      | 6,18                      | 6,16                      |
| SAST_120NaCl | 48,1             | 294                     | 6,17                      | 6,19                      | 6,18                      |
| SAS_120NaCl  | 48,6             | 300                     | 6,17                      | 6,17                      | 6,18                      |

С помощью HAC не выявили каких-либо тенденций к увеличению количества частиц размером >10 мкм, хотя в составе SAST\_120NaCl выявили незначительное увеличение количества частиц размером >2 и >5 мкм. Как показано на фиг. 4-6, в ходе анализа с помощью HIC, dSEC или SEC не выявили значительных отличий между составами. С помощью SEC не выявили значительных изменений между составами после воздействия пятью циклами замораживания-оттаивания. См. фиг. 7.

Заключение: результаты исследования к настоящему времени показали, что новый тестируемый состав оставался аналогичным современному коммерческому составу после 52 недель хранения в криососудах из нержавеющей стали при -30°C, а также при 4°C.



## Пример 5. Замена на растворы SAS и PASS.

Цель этих примеров заключалась в том, чтобы подвергнуть диализу различные препараты на основе этанерцепта в TMS (трис, маннит, сахароза) до тестируемого состава (L-аргинин, сахароза, NaCl) и сравнить конечный показатель pH с целевым показателем pH.

Материалы: этанерцепт: 25 мг/мл в TMS (10 mM Трис-HCl, 4% маннита, 1% сахарозы, pH 7,4); раствор SAS\_100NaCl (100 mM NaCl, 25 mM L-аргинина HCl, 1% сахарозы, pH 6,3) для диализа; буфер PASS (25 mM фосфата, 100 mM NaCl, 25 mM L-аргинина HCl, 1% сахарозы, pH 6,3); центрифужные пробирки с мембранным фильтром Centriprep MWCO 10000; кассеты для диализа объемом 3-12 мл Slide-A-Lyzer, MWCO 10000; pH-метр Mettler Toledo MP220 и Mettler Toledo InLab MicroProbe.

Способы: для примера с UF/DF 25 мг/мл этанерцепта в TMS концентрировали до ~50 мг/мл путем ультрафильтрации с использованием кассет MWCO 30K Pellicon 3 на мини-системе Millipore Pellicon-2. Затем материал подвергали диафильтрации против раствора SAS\_100NaCl или PASS на протяжении 7 объемов диафильтрации, после чего концентрировали ультрафильтрацией до 100 мг/мл. В качестве примера с диализом 25 мг/мл этанерцепта в TMS концентрировали до 50 мг/мл с помощью центрифужных пробирок с мембранным фильтром centripreps MWCO 10000. Показатель pH образца с концентрацией 50 мг/мл в TMS, как и диализного раствора SAS измеряли с использованием pH-метра Mettler Toledo MP220 и InLab MicroProbe. Затем материал подвергали диализу с использованием кассет для диализа MWCO 10000 Slide-A-Lyzer. 9,5 мл 50 мг/мл этанерцепта в TMS добавляли в кассету и осуществляли замену против 1000 мл SAS100. Проводили три замены для достижения 1000000-кратной замены. Первую замену осуществляли в 5 ч вечера в день 1, и она продолжалась всю ночь. Вторую замену объемом 1000 мл осуществляли в 8 ч 30 мин утра в день 2. Третью и последнюю замену осуществляли в 12 ч 30 мин в день 2. В 5 ч вечера в день 2 белок удаляли из кассеты для диализа (удалено 11 мл) и показатель pH измеряли с помощью того же pH-метра Mettler Toledo MP220. Измеренный показатель pH составил 6,98.

Результаты: краткое изложение результатов показано в табл. 17.

Таблица 17

Показатель pH при использовании различных способов замены и растворов

| Способ замены | Название образца                         | Показатель pH раствора для фильтрации | Показатель pH до проведения замены | Показатель pH после проведения замены | Количество замен        |
|---------------|------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| UF/DF         | PASS, показатель pH 6,3, 100 мг/мл       | 6,34                                  | 7,56                               | 6,34                                  | 7 объемов Диафильтрации |
| UF/DF         | SAS_100NaCl показатель pH 6,3, 100 мг/мл | 6,38                                  | 7,56                               | 6,98                                  | 7 объемов Диафильтрации |
| Диализ        | SAS_100NaCl показатель pH 6,3, 50 мг/мл  | 6,29                                  | 7,56                               | 6,98                                  | 1000000-кратная замена  |

Заключение: когда образцы подвергали ультрафильтрации/диафильтрации из раствора до проведения замены при показателе pH 7,56 в буфер PASS, то достигали целевого показателя pH 6,34. Однако когда образцы подвергали ультрафильтрации/диафильтрации в раствор SAS\_100NaCl, тогда достигнутый показатель pH материала после диализа составил 6,98, что было выше, чем ожидалось, и не было близко к конечному целевому показателю pH 6,3. Использование диализа в качестве способа замены на SAS\_100NaCl приводило к тем же результатам.

## Пример 6. Пул UF/DF.

Введение: раствор состава, который выбрали после данного исследования, назвали SAS (120 mM хлорида натрия, 25 mM L-аргинина, 1% сахарозы, pH 6,3) без добавления фосфатного буфера. Поскольку предыдущий пример продемонстрировал, что было сложно достичь целевого показателя pH 6,3 как при проведении диализа, так и при использовании UF/DF, когда начинали с этанерцепта в образце при pH 7,56, был необходим другой способ замены на состав SAS. Оценивали два способа, в которых использовали разный исходный материал конечной UF/DF: 1) промежуточный пул колонки 3 (AEX) в качестве исходного материала и 2) лекарственное вещество Enbrel в буфере для составления PASS (промежуточный пул PASS DS) в качестве исходного материала. Каждый способ описан ниже, и в нем кратко изло-

жена разработка конечной стадии технологической операции для установки UF/DF для получения 50 г/л этанерцепта в составе SAS, включая приготовление раствора состава SAS, кондиционирование и обработку конечной загрузки UF/DF.

Способы: раствор состава SAS состоит из 120 мМ хлорида натрия, 25 мМ L-аргинина, 1% сахарозы, показатель pH 6,3. Раствор состава SAS титровали до показателя pH 6,3, используя 10 н. NaOH. Объем титранта, необходимый для достижения определенного диапазона pH, составлял 4,4 мкл/л раствора состава SAS. В ходе выполнения конечной технологической операции с помощью установки UF/DF SAS после уравнивания мембран при 10 л/м<sup>2</sup> раствором состава SAS показатель pH пермеата оставался близким к показателю pH WFI, но не показатель pH раствора состава SAS. Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что это является результатом низкой буферной емкости раствора состава SAS. Ожидаемый диапазон проводимости пермеата после уравнивания мембраны с использованием диапазона препарата раствора для состава SAS составляет 12-16 мСм/см. Ожидается более высокий показатель pH после уравнивания, чем у раствора для состава SAS, но это не должно вызывать беспокойство или указывать на то, что мембраны не уравниваются.

Исходный материал промежуточного пула AEX: перед переносом промежуточного пула AEX в резервуар для ретентата резервуара UF/DF пул кондиционировали с использованием 2 М HCl до целевого показателя pH 6,3 (приемлемый диапазон 6,2-6,4). Объем титранта, требуемый для достижения определенного диапазона pH, составлял примерно 2,8 мл/л промежуточного пула AEX.

Восемь примеров, выполненных в ходе разработки конечной технологической операции установки для UF/DF SAS с использованием промежуточного пула AEX в качестве исходного материала, приведены в табл. 18. Исследовали два параметра: показатель pH кондиционированного промежуточного пула AEX и показатель pH раствора состава SAS. В первые три прогона анализировали показатель pH, проводимость, осмоляльность, концентрацию белка и качество продукта. В прогонах с 4 по 7 измеряли только показатель pH, проводимость, осмоляльность и концентрацию белка, чтобы определить влияние показателя pH раствора состава и влияние показателя pH при загрузке на показатель pH пула UF/DF.

Таблица 18

Исходный материал промежуточного пула AEX:  
показатели pH загрузки, раствора для замены и конечного пула UF/DF

| Номер прогона | Целевой показатель pH при загрузке | Целевой показатель pH SAS | Показатель pH пула UF/DF |
|---------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1             | 6,3                                | 6,3                       | 6,26                     |
| 2             | 6,3                                | 6,3                       | 6,33                     |
| 3             | 6,3                                | 6,3                       | 6,22                     |
| 4             | 6,3                                | 5,6                       | 6,22                     |
| 5             | 6,2                                | 5,3                       | 6,06                     |
| 6             | 6,4                                | 7,3                       | 6,94                     |
| 7             | 6,2                                | 5,6                       | 6,14                     |
| 8             | 6,4                                | 6,5                       | 6,43                     |

Результаты: результаты по качеству продукта для конечного пула UF/DF SAS, полученные с использованием промежуточного пула AEX в качестве исходного материала, показаны в табл. 19. Выход на стадии для прогона 1 был вне критериев приемлемости; тем не менее это, скорее всего, было артефактом лабораторной обработки и считалось не значимым для результатов исследования. Все три конечных прогона UF/DF SAS также соответствовали критериям приемлемости качества продукта согласно использованию анализа SEC и HIC, как описано выше.

Таблица 19

Исходный материал промежуточного пула AEX:  
качество продукта конечного пула UF/DF SAS

| Параметр      | Критерии приемлемости | Конечный пул UF/DF SAS |          |          |
|---------------|-----------------------|------------------------|----------|----------|
|               |                       | Прогон 1               | Прогон 2 | Прогон 3 |
| Показатель pH | 6,1–6,5               | 6,26                   | 6,22     | 6,33     |

|                     |        |       |       |       |
|---------------------|--------|-------|-------|-------|
| Концентрация белка  | 49–51  | 50,08 | 49,68 | 49,90 |
| Выход на стадии (%) | 95–103 | 93,4  | 99,5  | 100,5 |

Стабильность кондиционированного промежуточного пула AEX.

Кондиционированный промежуточный пул AEX можно хранить до 52,6 ч при контролируемой комнатной температуре (CRT). Показатель pH пула в ходе хранения показан на фиг. 8.

Стабильность пула UF/DF.

Конечный пул UF/DF SAS, созданный с использованием промежуточного пула AEX в качестве исходного материала, может храниться до 96,3 ч при CRT. Показатели pH и проводимости в ходе хранения показаны на фиг. 9А и В. В течение 96,3 ч хранения показатель pH и проводимость остаются в допустимых пределах.

Исходный материал промежуточного пула PASS DS: кондиционирование перед переносом промежуточного пула PASS DS в резервуар для ретентата UF/DF не требуется, поскольку промежуточный пул PASS DS уже находится в приемлемом диапазоне pH. Кроме того, поскольку исходный материал представляет собой Enbrel DS при концентрации 50 мг/мл, составленный в PASS, то пул не нужно концентрировать до 50 г/л, поскольку он уже находится в правильной концентрации для проведения диализа.

Один пример, проведенный в ходе разработки конечной технологической операции в установке для UF/DF SAS с целью оценки источника исходного материала, приведен в табл. 20. В этом примере в качестве исходного материала использовали промежуточный пул PASS DS и в нем анализировали показатель pH, проводимость, осмоляльность, концентрацию белка и качество продукта.

Таблица 20

Исходный материал промежуточного пула PASS DS:  
показатели pH загрузки, раствора для обмена и конечного пула UF/DF

| Номер прогона | Целевой показатель pH | Целевой показатель pH | Показатель pH пула UF/DF |
|---------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
|               | при загрузке          | раствора SAS          |                          |
| 1             | 6,3                   | 6,3                   | 6,23                     |

Результаты: результаты по качеству продукта для конечного пула UF/DF SAS, полученные с использованием промежуточного пула PASS DS в качестве исходного материала, показаны в табл. 21. Выход на стадии для прогона 1 был вне критериев приемлемости; тем не менее это, скорее всего, было артефактом лабораторной обработки и считалось не значимым для результатов исследования. Конечный пул UF/DF SAS также соответствовал критериям приемлемости качества продукта согласно использованию анализа SEC и HIC, как описано выше.

Таблица 21

Исходный материал промежуточного пула PASS DS:  
качество продукта конечного пула UF/DF SAS

| Параметр                   | Критерии приемлемости | Конечный пул UF/DF SAS |
|----------------------------|-----------------------|------------------------|
|                            |                       | Прогон 1               |
| Показатель pH              | 6,1–6,5               | 6,23                   |
| Концентрация белка (мг/мл) | 49–51                 | 49,60                  |
| Выход на стадии (%)        | 95–103                | 105,7                  |

Стабильность промежуточного пула PASS DS.

Пул PASS не требует кондиционирования перед обработкой UF/DF раствором SAS, поскольку этот промежуточный пул уже имеет целевой показатель pH (6,3). Исследование хранения пула для данного промежуточного пула не проводили, поскольку условия пула не изменялись относительно Enbrel PASS DS. Пул можно хранить до 96 ч при 25°C.

Стабильность пула UF/DF.

Конечный пул UF/DF SAS, созданный с использованием промежуточного пула PASS DS в качестве исходного материала, может храниться в течение до 96,3 ч при CRT. Показатели pH и проводимости в ходе хранения показаны на фиг. 9А и В. В течение 96,3 ч хранения показатель pH и проводимость остаются в допустимых пределах.

Стабильность раствора состава SAS.

Раствор состава SAS можно хранить при CRT до 28 дней. Показатели pH и проводимости показаны на фиг. 10А и В. В течение 42-дневного хранения в небольших камерах для изучения стабильности из

нержавеющей стали с небольшим свободным пространством показано, что раствор состава SAS поддерживает показатель pH в диапазоне от 5,6 до 6,5. В моменты времени день 35 и день 42 наблюдали образование осадка. Показатель в момент времени день 21, равный 5,09, представляется резко отклоняющимся значением по той причине, что последующие моменты времени соответствуют предлагаемым критериям приемлемости.

Заключение: конечная технологическая операция в установке для UF/DF позволяет получить продукт с составом SAS при 50 г/л и достичь постоянного качества продукта по сравнению с современным коммерческим продуктом с составом PASS согласно следующим рекомендациям способа: 1) использование или промежуточного пула AEX, или промежуточного пула PASS DS в качестве исходного материала; 2) раствор SAS может храниться в течение по меньшей мере 28 дней при CRT и поддерживать показатель pH в диапазоне от 5,6 до 6,5; 3) кондиционированный промежуточный пул AEX может храниться при CRT в течение по меньшей мере 52,6 ч и поддерживать показатель pH  $6,3 \pm 0,1$ ; и 4) пул UF/DF в составе SAS может храниться при CRT в течение по меньшей мере 96,3 ч и поддерживать показатель pH в диапазоне от 6,1 до 6,5 и проводимость в диапазоне от 10 до 14 мСм/см.

Пример 7. Альтернативные изотонические составы.

Целью данного примера было определение влияния повышенных уровней аргинина, сахарозы или хлорида натрия на агрегацию и стабильность этанерцепта при концентрации 75 мг/мл при 40°C. Уровни каждого из этих вспомогательных веществ были повышены с целью поддержания изотоничности состава без добавления фосфатного буфера. Кроме того, оценивали гистидин в качестве буфера для замены фосфата. Данные по тестируемым составам подытожены в табл. 22.

Таблица 22

Составы для альтернативных изотонических составов  
при показателе pH 6,3 с 0,01% PS20

| Название     | Буфер           | L-аргинин (мМ) | NaCl (мМ) | Сахароза |
|--------------|-----------------|----------------|-----------|----------|
| состава      |                 |                |           | (вес. %) |
| PASST        | 25 мМ фосфата   | 25             | 100       | 1%       |
| SAST 100NaCl | отсутствует     | 25             | 100       | 1%       |
| SAST 30Arg   | отсутствует     | 30             | 100       | 1%       |
| SAST 35Arg   | отсутствует     | 35             | 100       | 1%       |
| SAST 40Arg   | отсутствует     | 40             | 100       | 1%       |
| SAST 2Suc    | отсутствует     | 25             | 100       | 2%       |
| SAST 120NaCl | отсутствует     | 25             | 120       | 1%       |
| HASST        | 10 мМ гистидина | 25             | 100       | 1%       |

Материалы: в данном исследовании использовали лекарственное вещество Enbrel в PASS (25 мМ фосфатного буфера, 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы) при концентрации 50 мг/мл. Материал подвергали диализу с получением новых составов (без полисорбата) и концентрировали до 75 мг/мл, используя центрифужные пробирки с мембранным фильтром Centriprep MWCO 30000. 1% исходный раствор полисорбата 20 готовили свежим и добавляли во все составы до конечной концентрации 0,01%. Всеми составами вручную заполняли стеклянные 1 мл шприцы BD до объема 1,0 мл, а затем закрывали пробкой с помощью вакуумного укупорочного устройства ASPU.

Способы: показатель pH измеряли с использованием pH-метра Mettler Toledo в сочетании с Mettler MicroProbe. Перед измерениями образцы нагревали до комнатной температуры. Осмоляльность измеряли с использованием Advanced Osmometer Model 3900. Каждое измерение выполняли с использованием 250 мкл образца, и стандарты осмоляльности 290 мОсм тестировали для обеспечения надлежащей работы системы. Эксклюзионную HPLC проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2.

Результаты: концентрация, показатель pH и осмоляльность показаны в табл. 23. Степень агрегации при концентрации 75 мг/мл при 40°C была сходной с композицией на основе коммерческого состава для всех составов без добавления фосфата с повышенными уровнями L-аргинина, сахарозы и NaCl, что показано в табл. 24. Кроме того, применение гистидина вместо фосфата в качестве буфера приводило к повышению степени агрегации при 40°C.

Таблица 23

Концентрация, показатель pH и осмоляльность  
для альтернативных изотонических составов

| Образец      | Конц.<br>(мг/мл) | Показатель pH | Осмоляльность |
|--------------|------------------|---------------|---------------|
| PASST        | 76,3             | 6,27          | 308           |
| SAST_100NaCl | 76,8             | 6,30          | 266           |
| SAST_30Arg   | 74,9             | 6,28          | 271           |
| SAST_35Arg   | 76,9             | 6,27          | 280           |
| SAST_40Arg   | 76,5             | 6,26          | 288           |
| SAST_2Suc    | 75,2             | 6,26          | 291           |
| SAST_120NaCl | 77,1             | 6,24          | 301           |
| HASST        | 76,3             | 6,36          | 272           |

Таблица 24

Уровни агрегаты/HMW согласно SEC, % от общего количества, при 40°C

| Образец      | 0-я<br>неделя | 1-я<br>неделя | 2-я<br>неделя | 4-я<br>неделя | 8-я<br>неделя | 12-я<br>неделя |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| PASST        | 2,3           | 5,3           | 6,6           | 12,0          | 16,1          | 26,1           |
| SAST_100NaCl | 2,3           | 5,0           | 6,4           | 11,0          | 15,3          | 24,1           |
| SAST_30Arg   | 2,4           | 5,1           | 6,6           | 11,3          | 15,9          | 24,8           |
| SAST_35Arg   | 2,4           | 5,2           | 6,8           | 11,5          | 16,7          | 25,3           |
| SAST_40Arg   | 2,4           | 5,1           | 6,7           | 11,0          | 16,1          | 23,7           |
| SAST_2Suc    | 2,4           | 4,9           | 6,6           | 10,7          | 16,2          | 23,4           |
| SAST_120NaCl | 2,4           | 5,0           | 6,9           | 11,0          | 16,7          | 23,7           |
| HASST        | 2,3           | 6,2           | 9,1           | 14,8          | 22,9          | 32,3           |

Пример 8. Стабильность составов с различными уровнями полисорбата 20.

Проводили долговременные исследования контроля стабильности этанерцепта при 0, 0,005, 0,01 и 0,015% полисорбата 20 в составе SAS при концентрации этанерцепта 50 мг/мл. Кроме того, тестировали состав SAST с высокой концентрацией этанерцепта, составляющей 100 мг/мл. Стабильность оценивали при заполнении 1 мл в шприцах объемом 1 мл с несъемной стеклянной иглой с использованием SE-HPLC, dSEC HPLC и оценки наличия взвешенных частиц (HIAC) после хранения при 4, 25 и 40°C. Осмоляльность, показатель pH и концентрацию белка тестировали только в момент времени ноль. Результаты исследования показали, что тестируемые составы с концентрацией 50 мг/мл оставались аналогичными современному коммерческому составу через 24 недели при рекомендованном хранении при 2-8°C, а также при повышенных температурах 25 и 40°C. Состав SAST 100 мг/мл действовал аналогично составам с концентрацией 50 мг/мл в том, что касается показателя pH и невидимых невооруженным глазом частиц; отличия в уровнях агрегации согласно SEC отнесли к концентрации белка.

Таблица 25

## Параметры состава при 50 мг/мл этанерцепта

| Название состава | Буфер         | Другие вспомогательные вещества            | Полисорбат | Конц. белка (мг/мл) |
|------------------|---------------|--------------------------------------------|------------|---------------------|
| PASS             | 25 мМ фосфата | 25 мМ L-аргинина, 100 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0          | 50                  |
| SAS000T          | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0          | 50                  |
| SAS005T          | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0,005      | 50                  |
| SAS010T          | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0,01       | 50                  |
| SAS015T          | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0,015      | 50                  |
| 100_SAS010T      | Отсутствует   | 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы | 0,010      | 100                 |

Материалы: в данном исследовании использовали лекарственное вещество Enbrel в TMS (10 мМ трис-буфера, 4% маннита, 1% сахарозы) при концентрации 25 мг/мл. Основной объем, используемый для состава SAS, титровали до показателя pH 6,3. Материал подвергали ультрафильтрации до ~50 мг/мл этанерцепта, затем подвергали диализу в PASS (25 мМ фосфата, 25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы) или SAS (25 мМ L-аргинина, 120 мМ NaCl, 1% сахарозы) при концентрации этанерцепта 50 мг/мл. Материал для варианта с высокой концентрацией затем подвергали ультрафильтрации до 100 мг/мл этанерцепта. 1%-ный исходный раствор полисорбата 20 готовили свежим и добавляли в составы до конечной концентрации, как изложено в табл. 25. Вручную всеми составами заполняли стеклянные 1 мл шприцы BD до объема 1 мл, а затем закрывали пробкой с помощью вакуумного укупорочного устройства ASPU.

Результаты и обсуждение: показатель pH для всех составов измеряли в момент времени ноль и через 12 недель при 40°C и 24 недели при 4 и 25°C. Каких-либо изменений в зависимости от времени или температуры хранения не выявили. Измеренные показатели pH для всех образцов можно найти в табл. 26. Не наблюдали смещения показателя pH после 12 недель хранения при 40°C или 24 недель при 4 и 25°C, и при этом все образцы соответствовали критериям приемлемости  $\pm 0,2$  единицы pH от целевого показателя pH 6,3. Концентрацию белка и осмоляльность во всех составах тестировали в момент времени ноль. Результаты по концентрации белка и осмоляльности для всех образцов можно найти в табл. 26.

Таблица 26

## Концентрация, осмоляльность и показатель pH

| Образец     | Конц. (мг/мл) | Осмоляльность (мОсм) | Показатель pH, t=0 | Показатель pH, 24 нед., 4°C | Показатель pH, 24 нед., 25°C | Показатель pH, 12 нед., 40°C |
|-------------|---------------|----------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| PASS        | 51,6          | 318                  | 6,32               | 6,34                        | 6,34                         | 6,33                         |
| SAS000T     | 52,1          | 306                  | 6,33               | 6,31                        | 6,33                         | 6,37                         |
| SAS005T     | 51,2          | 304                  | 6,33               | 6,30                        | 6,30                         | 6,32                         |
| SAS010T     | 51,5          | 304                  | 6,34               | 6,30                        | 6,30                         | 6,36                         |
| SAS015T     | 51,5          | 301                  | 6,30               | 6,30                        | 6,30                         | 6,35                         |
| 100_SAS010T | 102,8         | 304                  | 6,32               | 6,28                        | 6,29                         | 6,36                         |

SE-HPLC проводили для контроля уровней агрегации в зависимости от параметров состава, времени и температуры. Пик В представляет собой количество образовавшихся высокомолекулярных соединений (агрегатов). Результаты не показали отличий в пике В между PASS-контролем и составами без добавления буфера при всех температурах и соответствующих концентрациях белка (табл. 27-29). Пик В представляет общее количество агрегатов, выявленное при помощи SE-HPLC для этих составов. Все образцы с концентрацией 50 мг/мл оставались пригодными (пик В  $\leq 6\%$ ) после 24 недель хранения при 4 и 25°C и после 2 недель хранения при 40°C.

Невидимые невооруженным глазом частицы контролировали путем подсчета частиц в режиме светотени (НІАС). Результаты соответствовали накопленным данным PFS и были одинаковыми для всех составов при всех температурах после 24 недель (табл. 30).

Таблица 27

Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 4°C

| Образец     | t=0 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|-------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| PASS        | 1,7      | 1,7      | 1,7      | 1,7       | 1,8       |
| SAS000T     | 1,7      | 1,8      | 1,8      | 1,8       | 1,9       |
| SAS005T     | 1,7      | 1,8      | 1,8      | 1,8       | 1,9       |
| SAS010T     | 1,7      | 1,8      | 1,8      | 1,9       | 1,9       |
| SAS015T     | 1,7      | 1,8      | 1,8      | 1,8       | 1,9       |
| 100_SAS010T | 1,9      | 2,0      | 2,1      | 2,2       | 2,4       |

Таблица 28

Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 25°C

| Образец     | t=0 нед. | t=2 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| PASS        | 1,7      | 2,1      | 2,4      | 2,9      | 3,5       | 4,8       |
| SAS000T     | 1,7      | 2,1      | 2,5      | 2,9      | 3,5       | 5,0       |
| SAS005T     | 1,7      | 2,2      | 2,5      | 2,9      | 3,5       | 4,9       |
| SAS010T     | 1,7      | 2,1      | 2,5      | 3,0      | 3,6       | 4,8       |
| SAS015T     | 1,7      | 2,2      | 2,4      | 3,0      | 3,5       | 4,8       |
| 100 SAS010T | 1,9      | 2,8      | 3,4      | 4,4      | 5,4       | 7,6       |

Таблица 29

Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 40°C

| Образец     | t=0 нед. | t=2 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. |
|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------|
| PASS        | 1,7      | 5,7      | 10,4     | 17,4     | 20,6      |
| SAS000T     | 1,7      | 4,9      | 8,9      | 15,4     | 19,2      |
| SAS005T     | 1,7      | 5,2      | 9,1      | 15,9     | 19,4      |
| SAS010T     | 1,7      | 5,2      | 9,3      | 15,8     | 19,2      |
| SAS015T     | 1,7      | 5,4      | 9,4      | 15,9     | 19,0      |
| 100 SAS010T | 1,9      | 9,0      | 15,6     | 24,5     | 27,1      |

Таблица 30

Частицы/мл (режим светотени), 4°C

|             | 2 мкм    |           | 10 мкм   |           | 25 мкм   |           |
|-------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|
|             | t=0 нед. | t=24 нед. | t=0 нед. | t=24 нед. | t=0 нед. | t=24 нед. |
| PASS        | 19197    | 3422      | 1785     | 670       | 25       | 67        |
| SAS000T     | 13004    | 4489      | 1265     | 762       | 60       | 104       |
| SAS005T     | 12344    | 1292      | 502      | 59        | 7        | 4         |
| SAS010T     | 11964    | 2254      | 1058     | 167       | 9        | 2         |
| SAS015T     | 11388    | 7283      | 934      | 591       | 2        | 4         |
| 100 SAS010T | 58087    | 8931      | 559      | 816       | 3        | 0         |

Заключение: долговременную стабильность измененного кандидатного состава при концентрации этанерцепта 50 мг/мл с уровнями полисорбата от 0 до 0,015% и современного коммерческого состава оценивали при 4, 25 и 40°C; в случае составов SAS010T также тестировали вариант с высокой концентрацией этанерцепта, составляющей 100 мг/мл. Не наблюдали значительных отличий между составами при соответствующих концентрациях белка через 24 недели с помощью анализов SE, dSEC или HIC HPLC, а также с помощью режима светотени. Не выявили смещения показателя pH, и при этом все составы оставались в приемлемых диапазонах. Результаты исследования показали, что составы SAST\_120NaCl при концентрации 50 мг/мл были стабильны и аналогичны современному коммерческому составу через 24 недели при рекомендуемой температуре хранения от 2 до 8°C.

Пример 9. Стабильность составов в пластиковых шприцах.

Проводили долговременное исследование с целью контроля стабильности этанерцепта в составах PASS и SAS при концентрации этанерцепта 50 мг/мл в системах предварительно заполненных пластиковых шприцев COP, не содержащих силиконовое масло, по сравнению со стеклянными силиконизированными предварительно заполненными шприцами. Стабильность оценивали при заполнении 1 мл в различных системах шприцев с использованием SE-HPLC, показателя pH и оценки наличия взвешенных частиц (НИАС) после хранения при 4, 25 и 40°C. Концентрацию белка тестировали только в момент времени ноль.

Материалы: для данного исследования использовали лекарственное вещество этанерцепт в TMS (10 mM трис-буфера, 4% маннита, 1% сахарозы) при концентрации 25 мг/мл. Основной объем, используемый для состава SAS, титровали до показателя pH 6,3. Материал подвергали ультрафильтрации до ~50 мг/мл этанерцепта, затем подвергали диалфильтрации в PASS (25 mM фосфата, 25 mM L-аргинина, 120 mM NaCl, 1% сахарозы) или SAS (25 mM L-аргинина, 120 mM NaCl, 1% сахарозы) при концентрации этанерцепта 50 мг/мл.

Всеми составами вручную заполняли 1 мл стеклянные шприцы или пластиковые шприцы COP объ-

емом 1 мл, не содержащие силиконовое масло (COP A и COP B), до объема 1 мл, а затем закрывали пробкой с помощью вакуумного укупорочного устройства.

Способы: показатель pH измеряли с использованием pH-метра Mettler Toledo SevenEasy в сочетании с Mettler InLab MicroProbe. Перед измерениями образцы нагревали до комнатной температуры. Измерения концентрации белка на основании абсорбции при 280 нм для всех образцов проводили при комнатной температуре с использованием системы Nano Drop. Эксклюзионную HPLC проводили на HPLC Agilent 1100 с программным обеспечением Chromeleon 7.2. Анализ невидимых невооруженным глазом частиц проводили с использованием системы счетчика частиц HACH HIAC/Royco, оснащенной лазером HRLD-150 и программным обеспечением Pharm Spec. Все образцы разводили буфером для составления PASS до 25 мг/мл. Образцы тщательно перемешивали, не закрывали и дегазировали в течение 2 ч при 75 торр перед анализом. Проводили анализ четырех проб по 1,0 мл каждая (без объема тары), с первой отброшенной пробой и усреднением оставшихся трех проб. Данные для размеров частиц 2, 5, 10 и 25 мкм собирали во все моменты времени. Результаты учитывают разбавление и представлены как накопленная встречаемость на 1 мл.

Результаты и обсуждение: стабильность в пластиковых, не содержащих силиконовое масло шприцах аналогична стабильности в стеклянных силиконизированных шприцах. Концентрацию белка во всех составах тестировали в момент времени ноль. Показатель pH для всех составов измеряли в момент времени ноль и через 12 недель при 40°C и 24 недели при 4 и 25°C. Каких-либо изменений в зависимости от времени или температуры хранения не выявили, и при этом все образцы соответствовали критериям приемлемости по показателю pH, составляющему  $\pm 0,2$  единицы pH от целевого показателя pH 6,3. Результаты по концентрации белка и измеренным показателям pH для всех образцов можно найти в табл. 31.

Таблица 31

## Результаты по концентрации белка и показателю pH

| Образец    | Концентрация (мг/мл) | Показатель pH, | Показатель pH, | Показатель pH, | Показатель pH, |
|------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|            |                      | т=0            | 24 нед., 4°C   | 24 нед., 25°C  | 12 нед., 40°C  |
| PASS_Glass | 50,9                 | 6,3            | 6,4            | 6,4            | 6,4            |
| SAS_Glass  | 52,3                 | 6,3            | 6,4            | 6,4            | 6,3            |
| PASS_COP_A | 51,1                 | 6,3            | 6,4            | 6,4            | 6,3            |
| SAS_COP_A  | 51,9                 | 6,3            | 6,4            | 6,4            | 6,3            |
| PASS_COP_B | 51,1                 | 6,4            | 6,4            | 6,4            | 6,3            |
| SAS_COP_B  | 52,2                 | 6,3            | 6,4            | 6,4            | 6,3            |

SE-HPLC проводили для контроля уровней агрегации в зависимости от параметров состава, времени и температуры. Пик В представляет собой количество образовавшихся высокомолекулярных фрагментов (агрегатов). Результаты не показали отличий в пике В между стеклянными шприцами и пластиковыми шприцами COP, не содержащими силиконовое масло (табл. 32-34). Пик В представляет общее количество агрегатов, выявленное при помощи SE-HPLC для этих составов. Все образцы оставались приемлемыми (пик В  $\leq 6\%$ ) после 24 недель хранения при 4 и 25°C.

Таблица 32

## Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 4°C

| Образец    | t=0  | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12 нед. | t=24 нед. |
|------------|------|----------|----------|-----------|-----------|
|            | нед. |          |          |           |           |
| PASS_Glass | 2,9  | 3,0      | 3,1      | 3,1       | 3,1       |
| SAS_Glass  | 3,0  | 3,1      | 3,2      | 3,2       | 3,1       |
| PASS_COP_A | 2,9  | 3,0      | 3,1      | 3,1       | 3,1       |
| SAS_COP_A  | 3,0  | 3,1      | 3,2      | 3,2       | 3,2       |
| PASS_COP_B | 3,0  | 3,1      | 3,2      | 3,2       | 3,3       |
| SAS_COP_B  | 3,0  | 3,1      | 3,2      | 3,2       | 3,2       |

Таблица 33

## Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 25°C

| Образец    | t=0  | t=2  | t=4  | t=8  | t=12 | t=24 |
|------------|------|------|------|------|------|------|
|            | нед. | нед. | нед. | нед. | нед. | нед. |
| PASS_Glass | 2,9  | 3,0  | 3,4  | 3,9  | 4,4  | 5,5  |
| SAS_Glass  | 3,0  | 3,1  | 3,6  | 4,1  | 4,5  | 5,6  |



|            |     |     |     |     |     |     |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| PASS_COP_A | 2,9 | 3,1 | 3,4 | 3,9 | 4,4 | 5,4 |
| SAS_COP_A  | 3,0 | 3,2 | 3,5 | 4,1 | 4,6 | 5,8 |
| PASS_COP_B | 3,0 | 3,2 | 3,6 | 4,1 | 4,6 | 5,5 |
| SAS_COP_B  | 3,0 | 3,1 | 3,5 | 4,0 | 4,5 | 5,7 |

Таблица 34

Анализ пика В с помощью SEC, % от общего количества, 40°C

| Образец    | t=0<br>нед. | t=2 нед. | t=4 нед. | t=8 нед. | t=12<br>нед. |
|------------|-------------|----------|----------|----------|--------------|
| PASS_Glass | 2,9         | 6,4      | 11,1     | 17,2     | 23,0         |
| SAS_Glass  | 3,0         | 6,1      | 9,8      | 15,4     | 21,0         |
| PASS_COP_A | 2,9         | 6,5      | 9,9      | 16,2     | 21,4         |
| SAS_COP_A  | 3,0         | 6,3      | 9,9      | 14,9     | 18,6         |
| PASS_COP_B | 3,0         | 6,4      | 10,7     | 17,8     | 19,6         |
| SAS_COP_B  | 3,0         | 6,2      | 10,0     | 17,1     | 22,4         |

Невидимые невооруженным глазом частицы контролировали путем подсчета частиц в режиме светотени (НПАС). Результаты для составов, помещенных в стеклянные шприцы BD, соответствовали накопленным данным PFS, в то время как в пластиковых шприцах, не содержащих силиконовое масло, количество невидимых невооруженным глазом частиц уменьшилось (табл. 35).

Таблица 35

Частицы/мл (режим светотени), 4°C

|            | 2 мкм       |              | 10 мкм      |              | 25 мкм      |              |
|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
|            | t=0<br>нед. | t=24<br>нед. | t=0<br>нед. | t=24<br>нед. | t=0<br>нед. | t=24<br>нед. |
| PASS_Glass | 10090       | 15994        | 468         | 726          | 14          | 2            |
| SAS_Glass  | 12240       | 13340        | 1183        | 505          | 18          | 5            |
| PASS_COP_A | 93          | 130          | 2           | 6            | 0           | 0            |
| SAS_COP_A  | 30          | 74           | 2           | 2            | 0           | 0            |
| PASS_COP_B | 81          | 204          | 3           | 4            | 0           | 2            |
| SAS_COP_B  | 62          | 237          | 2           | 8            | 0           | 1            |

Заключение: долговременную стабильность состава SAS при концентрации этанерцепта 50 мг/мл и современного коммерческого состава на основе этанерцепта, хранящихся в стеклянных силиконизированных шприцах и шприцах COP, не содержащих силиконовое масло, оценивали при 4, 25 и 40°C. С помощью SE-HPLC не выявили значимых отличий между составами в зависимости от типа шприца через 24 недели. Не выявили смещения показателя pH, и при этом все составы оставались в приемлемых диапазонах. Количество невидимых невооруженным глазом частиц было уменьшено в пластиковых шприцах COP, не содержащих силиконовое масло, и оно соответствовало накопленным результатам PFS при хранении в стеклянных шприцах. Результаты исследования показали, что состав SAS при концентрации этанерцепта 50 мг/мл был стабильным и аналогичен современному коммерческому составу после 24 недель хранения при рекомендуемой температуре от 2 до 8°C в различных типах шприцев.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая от 75 до 150 мМ NaCl, от 5 до 100 мМ аргинина, от 0,5 до 2% (мас./об.) сахарозы и от 40 до 100 мг/мл этанерцепта, где фармацевтическая композиция содержит менее 2,0 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта, и показатель pH композиции составляет от 6,1 до 6,5.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где фармацевтическая композиция содержит менее 1,5 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, где:

а) фармацевтическая композиция содержит менее 1,0 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта;

б) фармацевтическая композиция содержит менее 0,5 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта;

с) фармацевтическая композиция содержит менее 0,25 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта; или

д) фармацевтическая композиция содержит 0,1 мМ или меньше общего буферного средства, отличного от этанерцепта.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где аргинин представляет собой L-аргинин.
5. Фармацевтическая композиция по п.4, где:
  - a) L-аргинин представляет собой L-аргинина гидрохлорид или
  - b) L-аргинин представляет собой L-аргинин в форме основания.
6. Фармацевтическая композиция по п.1, где показатель pH фармацевтической композиции составляет от 6,1 до 6,5 при хранении при контролируемой комнатной температуре (CRT) в течение 2 недель.
7. Фармацевтическая композиция по п.6, где показатель pH фармацевтической композиции составляет от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,3 при хранении при контролируемой комнатной температуре (CRT) в течение 2 недель.
8. Фармацевтическая композиция по п.1, где:
  - a) показатель pH фармацевтической композиции составляет от 5,8 до 6,7 в течение по меньшей мере двух недель при хранении примерно при 25°C и менее 6% от общего этанерцепта агрегировано в высокомолекулярной форме, что было определено с применением эксклюзионной хроматографии;
  - b) показатель pH указанной фармацевтической композиции составляет от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,5 в течение по меньшей мере двух недель в ходе указанного хранения примерно при 25°C; или
  - c) показатель pH указанной фармацевтической композиции составляет от приблизительно 6,2 до приблизительно 6,4 в течение по меньшей мере двух недель в ходе указанного хранения примерно при 25°C; или
  - d) менее 28% от общего количества этанерцепта находится в неправильно уложенной форме, что определено с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия после двухнедельного хранения примерно при 25°C.
9. Фармацевтическая композиция по п.1, где:
  - a) фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 180 до приблизительно 420 мОсм;
  - b) фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 350 мОсм;
  - c) фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 290 до приблизительно 310 мОсм; или
  - d) фармацевтическая композиция характеризуется осмоляльностью, составляющей от приблизительно 300 до приблизительно 310 мОсм.
10. Фармацевтическая композиция по п.1, состоящая из приблизительно 50 мг/мл этанерцепта, приблизительно 120 mM NaCl, приблизительно 25 mM L-аргинина гидрохлорида, приблизительно 1% (мас./об.) сахарозы и воды.
11. Фармацевтическая композиция по п.1, дополнительно содержащая полисорбат 20.
12. Фармацевтическая композиция по п.11, содержащая полисорбат 20 (мас./об.) в концентрации от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,1%.
13. Фармацевтическая композиция по п.12, содержащая полисорбат 20 (мас./об.) в концентрации приблизительно 0,005%, приблизительно 0,01% или приблизительно 0,015%.
14. Способ получения фармацевтической композиции на основе этанерцепта, которая имеет показатель pH, составляющий от 6,1 до 6,5, включающий замену состава на основе этанерцепта, содержащего буферное средство, отличное от этанерцепта, на раствор без какого-либо дополнительного буферного средства, тем самым получая фармацевтическую композицию, содержащую от 40 до 100 мг/мл этанерцепта и менее 2,0 mM общего буферного средства, отличного от этанерцепта, где каждый из состава на основе этанерцепта, содержащего буферное средство, отличное от этанерцепта, и раствор без какого-либо дополнительного буферного средства, характеризуется показателем pH, составляющим от 6,1 до 6,5.
15. Способ по п.14:
  - a) где на стадии замены применяют диафильтрацию;
  - b) где раствор без какого-либо дополнительного буферного средства является изотоническим;
  - c) где раствор без какого-либо дополнительного буферного средства содержит сахарозу, аргинин и NaCl;
  - d) дополнительно включающий стадию фильтрации фармацевтической композиции; или
  - e) дополнительно включающий стадию разделения фармацевтической композиции на аликвоты в виде готовой лекарственной формы.
16. Способ по п.14, где раствор без какого-либо дополнительного буферного средства содержит сахарозу, аргинин и NaCl, где концентрация NaCl составляет от 75 до 150 mM, концентрация аргинина составляет от 5 до 100 mM и концентрация сахарозы составляет от 0,5 до 2% (мас./об.).
17. Способ по п.14, где раствор без какого-либо дополнительного буферного средства состоит из приблизительно 120 mM NaCl, приблизительно 25 mM аргинина, приблизительно 1% (мас./об.) сахарозы и воды.

18. Способ по п.14, где состав на основе этанерцепта, содержащий буферное средство, отличное от этанерцепта, содержит от 75 до 150 мМ NaCl, раствор без какого-либо дополнительного буферного средства содержит от 75 до 150 мМ NaCl и фармацевтическая композиция содержит от 75 до 150 мМ NaCl, где способ не включает стадию удаления NaCl.

19. Способ по п.18, где состав на основе этанерцепта, содержащий буферное средство, содержит приблизительно 120 мМ NaCl, раствор без какого-либо дополнительного буферного средства, отличного от этанерцепта, содержит приблизительно 120 мМ NaCl и фармацевтическая композиция содержит приблизительно 120 мМ NaCl.

20. Способ по п.14, где состав на основе этанерцепта, содержащий буферный агент, отличный от этанерцепта, содержит соль, и способ не включает стадию удаления соли.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая от 75 до 150 мМ NaCl, от 5 до 100 мМ аргинина, от 0,5 до 2% (мас./об.) сахарозы и от 40 до 100 мг/мл этанерцепта, где фармацевтическая композиция содержит менее 2,0 мМ общего буферного средства, отличного от этанерцепта, и показатель pH композиции составляет от 6,1 до 6,5 и где фармацевтическая композиция получена способом по п.14.

22. Набор для лечения пациента, содержащий фармацевтическую композицию по п.1 в виде готовой лекарственной формы и инструкцию по хранению и применению.

23. Однодозовый контейнер для введения пациенту разовой дозы фармацевтической композиции, содержащий фармацевтическую композицию по п.1.

24. Однодозовый контейнер по п.23, где указанный однодозовый контейнер представляет собой флакон, шприц или шприц-ручку.

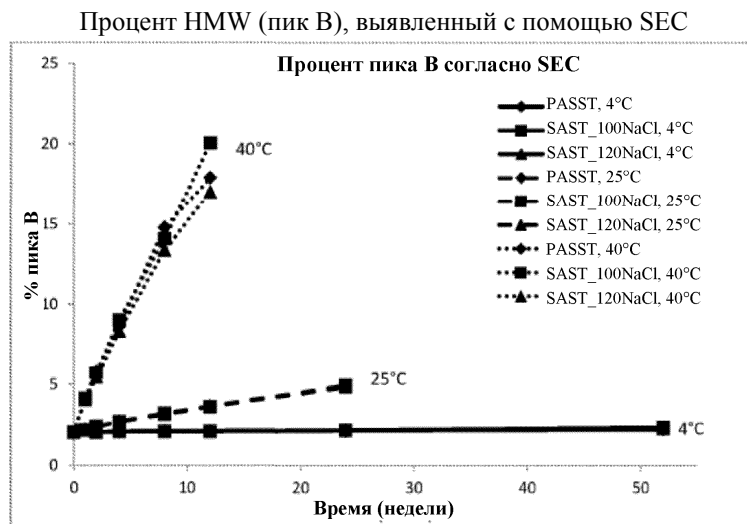
25. Однодозовый контейнер по п.23, содержащий водный состав, состоящий из этанерцепта при концентрации 50,0 мг/мл, хлорида натрия при концентрации 120 мМ, L-аргинина гидрохлорида при концентрации 25 мМ и сахарозы при концентрации 1,0% (мас./об.).

26. Способ по п.14, дополнительно включающий заполнение однодозового контейнера приблизительно однократной дозой фармацевтической композиции в стерильных условиях.

27. Способ по п.26, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит от 75 до 150 мМ NaCl, от 5 до 100 мМ аргинина и от 0,5 до 2% (мас./об.) сахарозы и где фармацевтическая композиция содержит менее 2,0 мМ общего буферного агента, отличного от этанерцепта.

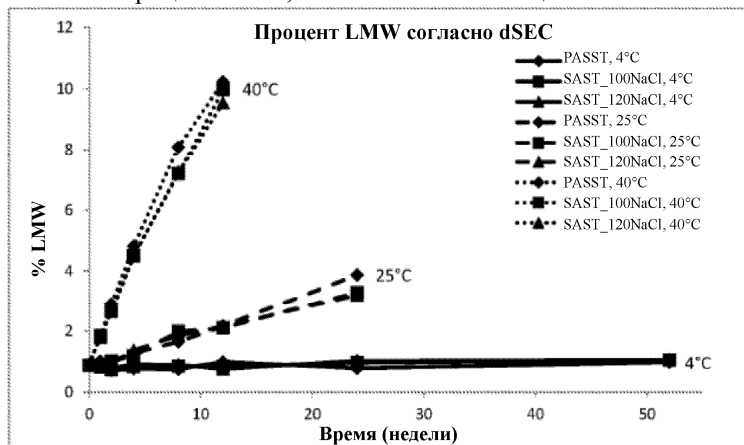
28. Фармацевтическая композиция по п.1 для лечения пациента с ревматоидным артритом, псориатическим артритом, анкилозирующим спондилитом или псориазом.

29. Способ лечения пациента с ревматоидным артритом, псориатическим артритом, анкилозирующим спондилитом или псориазом, включающий введение указанному пациенту фармацевтического состава по п.1.



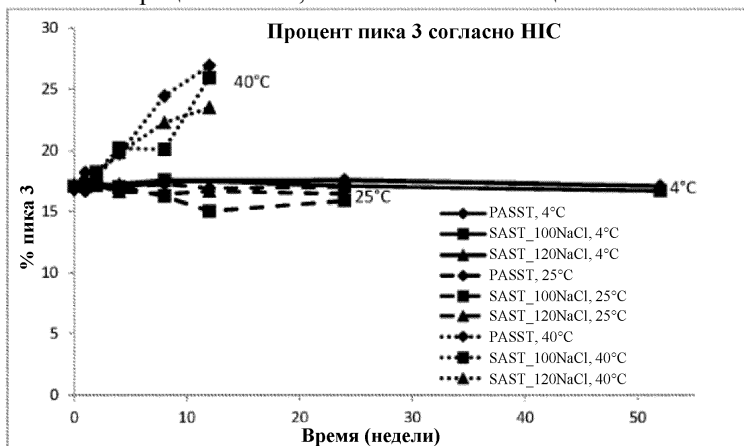
Фиг. 1

## Процент LMW, выявленный с помощью dSEC

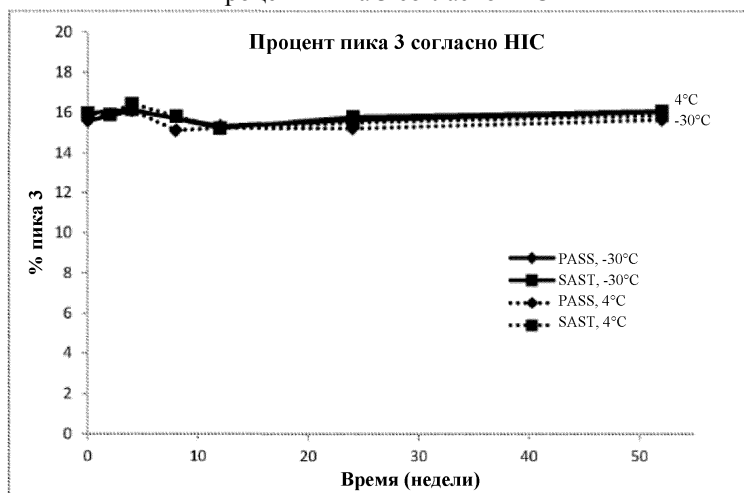


Фиг. 2

## Процент пика 3, выявленный с помощью HIC

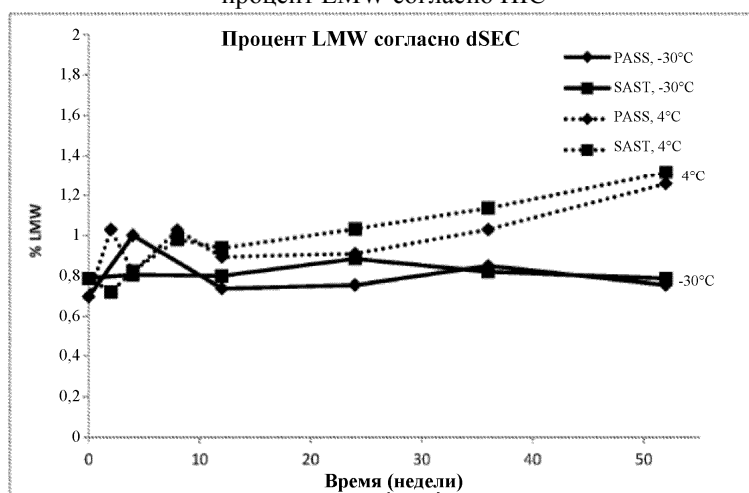


Фиг. 3

Хранение в криососуде из нержавеющей стали -  
процент пика 3 согласно HIC

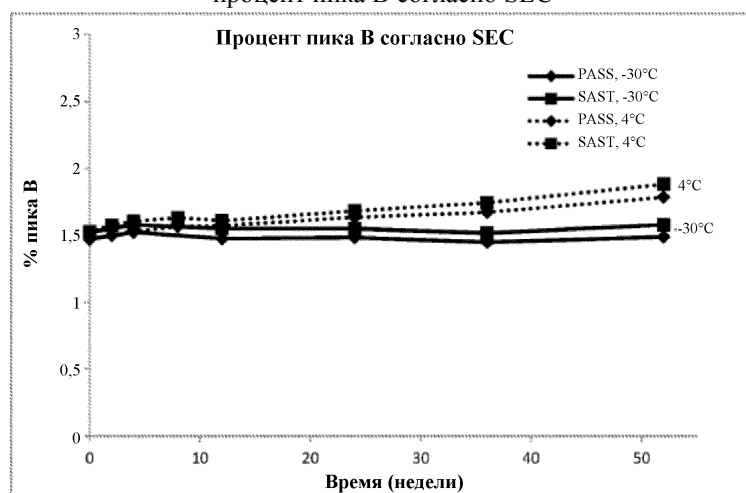
Фиг. 4

Хранение в криососуде из нержавеющей стали -  
процент LMW согласно НИС



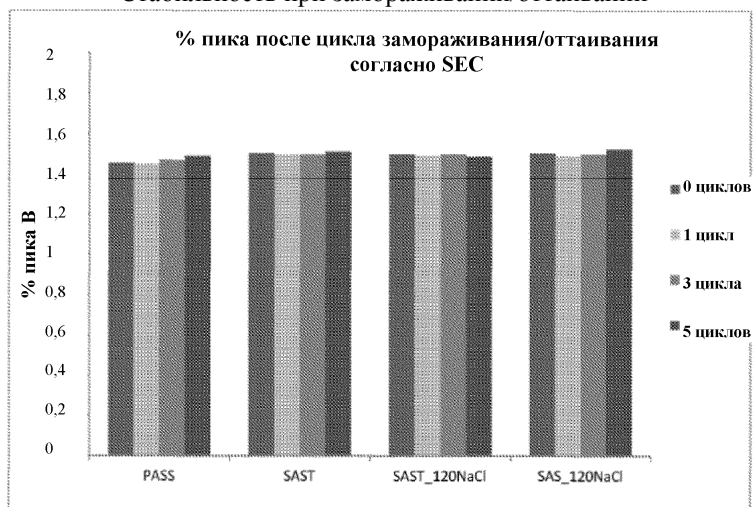
Фиг. 5

Хранение в криососуде из нержавеющей стали -  
процент пика В согласно SEC



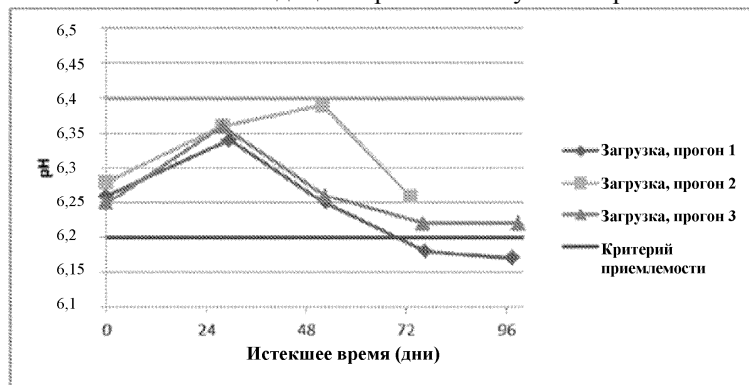
Фиг. 6

Стабильность при замораживании/оттаивании



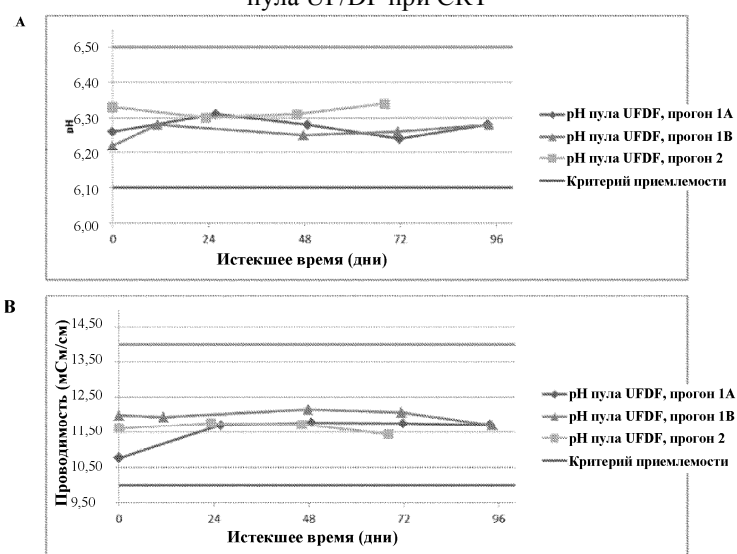
Фиг. 7

## Стабильность кондиционированного пула VF при CRT



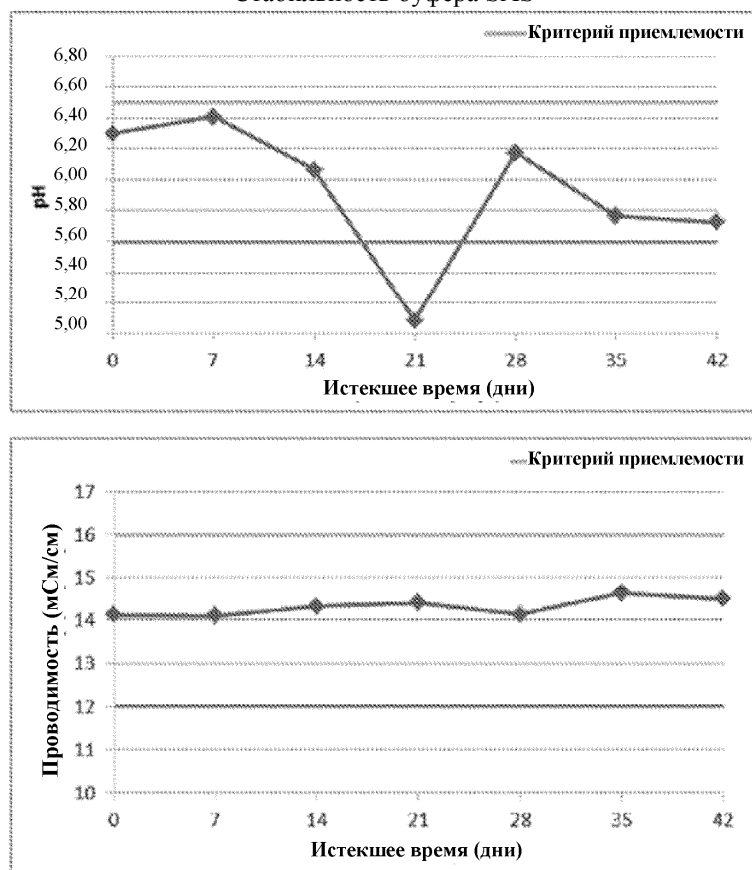
Фиг. 8

## Стабильность показателя pH и проводимости пула UF/DF при CRT



Фиг. 9

## Стабильность буфера SAS



Фиг. 10

