

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191646 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.14(22) Дата подачи заявки
2019.05.20(51) Int. Cl. C12N 9/82 (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 38/50 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

(54) ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПЕГАСПАРГАЗЫ

(31) 201821048859

(32) 2018.12.24

(33) IN

(86) PCT/IN2019/050402

(87) WO 2020/136666 2020.07.02

(71) Заявитель:
ДЖЕННОВА
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ЛИМИТЕД [ИН/ИН] (IN)(72) Изобретатель:
Мукхерджи Татагата, Агарвал
Правин Кумар, Сингх Санджай (IN)(74) Представитель:
Андреева Т.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новой, экономически целесообразной, стабильной при хранении лиофилизированной композиции пегаспаргазы. Композиция содержит пегаспаргазу, криопротектор, наполнитель, буфер и может по выбору содержать другие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, включая, но не ограничиваясь солью. Композиция настоящего изобретения стабильна в течение длительных периодов времени в значительном диапазоне температур, без присутствия какого-либо значительного количества примесей. Настоящее изобретение также относится к экономически целесообразному и масштабируемому способу лиофилизации для получения стабильной при хранении композиции пегаспаргазы.

A1

202191646

202191646

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ЛИОФИЛИЗИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПЕГАСПАРГАЗЫ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области биофармацевтических наук. В частности, оно относится к лиофилизированной композиции пегаспаргазы и способу ее получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Доставка белковых лекарств остается серьезной проблемой для биофармацевтической промышленности из-за присущей белкам нестабильности, проявляющейся *in vivo*. В то время как белки, вводимые перорально, чувствительны к их перевариванию в пищеварительном тракте, белки, вводимые парентерально, как правило, склонны к почечному клиренсу и протеолизу. Другие проблемы, которые обычно связаны с белковыми лекарствами, – это низкая растворимость, короткий период полужизни в кровотоке, иммуногенность, агрегация и т.д. В результате нарушается устойчивость белка в организме. Было опробовано несколько подходов для достижения устойчивости белков *in vivo*, таких как изменение аминокислотной последовательности для снижения иммуногенности и устранения сайтов протеолитического расщепления, конъюгация белков с белками сыворотки, слияние с антителами, включение в липосомы для медленного высвобождения, конъюгирование с естественными или синтетическими полимеры и т.д.

Конъюгирование терапевтических белков с полимерами, такими как полиэтиленгликоль (PEG), успешно используется в биофармацевтической промышленности в течение длительного времени и считается безопасной модификацией белков для увеличения периода полужизни в кровотоке, снижения иммуногенности, и раскрытие в этом отношении можно найти в патенте США US 4 179 337. Этот процесс конъюгации называется пегилированием. PEG был отнесен регулирующими органами, такими как USFDA и ВОЗ, к категории соединений, признанных в целом безопасными (GRAS).

PEG – это линейный или разветвленный полимер, растворимый в воде (растворимость увеличивается с увеличением молекулярной массы), липофильный и нетоксичный. Липофильность PEG делает его пригодным для функционализации концевых групп для быстрого конъюгации с терапевтическими белками. Каждая

молекула PEG обычно связывает 2–3 молекулы воды на единицу оксида этилена. Пегилирование, таким образом, маскирует поверхность белка и увеличивает размер молекулы полипептида, тем самым предотвращая доступ антител или клеток, обрабатывающих антиген, а также снижает разложение протеолитическими ферментами, что приводит к увеличению периода полужизни в кровотоке. Кроме того, увеличение размера (из-за увеличения гидродинамических радиусов) увеличивает время циркуляции за счет уменьшения почечного клиренса.

Во многих типах раковых клеток, например, при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), раковые клетки не способны синтезировать аминокислоту L-аспарагин *de novo* (потому что в них отсутствует или низкий уровень фермента аспарагинсинтетазы, который катализирует ферментативное преобразование аминокислоты L-аспартата в L-аспарагин) и забирает его из крови для роста клеток. L-аспарагиназа – это фермент, который катализирует гидролиз L-аспарагина до L-аспартата с высвобождением аммиака. L-аспарагиназа снижает уровень L-аспарагина в крови, тем самым предотвращая его захват раком/опухолевыми клетками, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. L-аспарагиназа может быть получена из нескольких источников, включая бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты и растения. Он полезен при лечении опухолей или рака, синтез белка которых зависит от L-аспарагина. В частности, он используется для лечения лейкозов, таких как острый лимфобластный лейкоз, и обычно используется в сочетании с другими противоопухолевыми или противораковыми методами лечения, хотя в определенных клинических ситуациях его можно применять отдельно.

Однако сама L-аспарагиназа страдает от обычных недостатков, присущих белку, таких как высокая скорость клиренса, короткий период полужизни, протеолитическая деградация и возможность индукции иммунного ответа из-за нечеловеческого происхождения у пациентов, получавших лечение этот фермент. Эти недостатки ограничивают использование этого фермента для более длительного лечения или повторного дозирования. Как обсуждалось ранее, эти проблемы можно решить с помощью пегилирования. L-аспарагиназа (из *E. coli*) модифицируется путем ковалентного конъюгирования ее с монометоксиполиэтиленгликолем 5 кДа (mPEG). Получающаяся в результате пегаспаргаза имеет то преимущество, что она по существу не антигенна и демонстрирует пониженную скорость выведения из кровотока.

Пегаспаргаза, обычно представленная в виде жидкой композиции в упаковке объемом 5 мл с концентрацией 750 Ш/мл, была первоначально одобрена Управлением США по контролю за продуктами и лекарствами США для лечения острого лимфобластного лейкоза у пациентов с гиперчувствительностью к нативным формам L-аспарагиназы. в 1994 году и была продана под торговой маркой Oncaspar®. Позже, в 2006 году, Онкаспар® получил одобрение для лечения пациентов первой линии с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в качестве компонента режима многоагентной химиотерапии. Oncaspar® получали пегилированием 5 кДа монометоксиполиэтиленгликоля (mPEG) сукцинимидилсукцинат PEG (также называемого SS-PEG). Пегилированная аспарагиназа описана в US 5,122,614; US 5,324,844; US 5,612,460; заявках US20120100121A1; CN105802946A.

Сообщается, что, несмотря на все преимущества, жидкий состав пегаспаргазы имеет такие проблемы, как термическая стабильность, строгие требования к поддержанию холодовой цепи, более короткий срок хранения и т.д. Сообщалось, что пегилированные белки, особенно те, которые связаны с сукцинатным линкером, имеют тенденцию разлагаться в своей жидкой композиции с образованием свободного PEG и сукцинированного белка в результате гидролиза сложноэфирной связи между PEG и сукцинатным линкером в водной композиции. Доступ к таким важным лекарствам в клинической практике требует композиций, которые можно хранить в течение длительного периода, что также может выдерживать скачки температуры во время производства и при распределении по клиникам.

Чаще всего проблемы стабильности, связанные с белками в жидкой композиции, можно преодолеть, представив ее в твердой композиции. Удаление воды часто оказывается эффективным, поскольку все основные реакции разложения (дезамидирование, гидролиз, протеолиз и т.д.) происходят в водном растворе. Наиболее распространенным методом преобразования жидкости в твердое вещество является сублимационная сушка или лиофилизация. Лيوфилизация – это процесс, который может помочь стабилизировать пегаспаргазу и преодолеть проблемы. Более половины терапевтических средств биологического происхождения, которые поступают в продажу, представлены в виде лиофилизированных композиций.

Цикл лиофилизации состоит в основном из трех этапов: замораживания,

первичной сушки и вторичной сушки с дополнительным этапом отжига между замораживанием и первичной сушкой. Процесс лиофилизации не лишен стресса и не всегда гарантирует длительный срок хранения биофармацевтического продукта. Стресс, связанный с этапами лиофилизации, может вызывать как физическое (денатурация, агрегация, осаждение и т.д.), так и химическое разрушение (окисление, реакция Майяра, ковалентная агрегация и т.д.) белка. Эти пути деградации, которые в конечном итоге приводят к потере его биологической активности, не исключают друг друга, поскольку часто один ведет к другому, и оба пути деградации в некоторой степени связаны.

Схема цикла лиофилизации зависит от концентрации белка, природы и количества наполнителей, стабилизаторов и других вспомогательных веществ, присутствующих в композиции. Важные термические параметры, такие как кажущаяся температура стеклования (T_g'), температура кристаллизации наполнителя и т.д., обычно определяются для композиций до разработки процесса, поскольку они служат ориентиром для установки параметров температуры и давления для каждого этапа, включая линейное изменение и время выдержки на каждой этапе цикла лиофилизации.

Пегилированные белки представляют собой другие сложности, которые необходимо решить для определения окончательного процесса лиофилизации, такие как состояние PEG, является ли он аморфным или кристаллическим, количество свободной воды, доступной для взаимодействия, температура хранения, параметры лиофилизации, отношение белка к PEG, каждый из которых влияет на активность лиофилизированного протеина после лиофилизации, и универсального решения для всех пегилированных продуктов не существует.

Следовательно, важно разработать уникальный процесс и состав для каждого белка, поскольку процесс и состав, подходящие для одного белка, могут быть неэффективными для другого.

В патентах US 6,180,096 и US 7,632,491 B2 описана композиция пегилированного интерферона 2b с более длительным циклом лиофилизации и высоким содержанием влаги. В US 8,367,054 B2 описана композиция для Peg-интерферона 2b с более коротким циклом лиофилизации. Эти документы раскрывают важность процесса лиофилизации и предполагают изменение качества продукта в зависимости от цикла лиофилизации.

CN105796507A раскрывает стабильную композицию пегаспаргазы, содержащую

сорбит, защитный агент, буферный агент и поверхностно-активное вещество. Однако композиция обеспечивает стабильность в жидкой форме и защиту при замерзании. Указанная заявка не смогла обеспечить стабильную лиофилизированную композицию.

W02018017190 раскрывает лиофилизированную стабильную при хранении композицию, содержащую полиалкиленоксид-аспарагиназу, содержащую полиалкиленоксидную группу, ковалентно связанную линкером с L-аспарагиназой; буфер; соль; и сахар.

Однако способ, описанный в W02018017190, является длительным (~5 дней) и неэкономичным. Более того, в нем используются большие количества вспомогательных веществ, что не является предпочтительным, поскольку может увеличить стоимость вспомогательного вещества на ~50% и, следовательно, стоимость конечного продукта.

Пегаспаргаза относится к категории орфанных препаратов и имеет высокую цену. Этот процесс приготовления стабильного при хранении продукта добавляет стоимость лиофилизации, а также дополнительные вспомогательные вещества, которые делают продукт более дорогостоящим.

Следовательно, существует потребность в оптимальной стабильной при хранении лиофилизированной композиции пегаспаргазы, которая сохраняет физические свойства и биологическую активность в течение срока ее хранения, и в процессе лиофилизации для такой композиции.

ЦЕЛЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является создание оптимальной стабильной при хранении лиофилизированной композиции, содержащей пегаспаргазу, которая проявляет физико-химическую стабильность и биологическую активность в течение срока ее хранения, и процесс лиофилизации для такой композиции.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение обеспечивает оптимальную стабильную при хранении лиофилизированную композицию, содержащую пегаспаргазу, которая проявляет физико-химическую стабильность и биологическую активность в течение срока ее хранения, и процесс лиофилизации для такой композиции.

Композиция по настоящему изобретению стабильна в течение продолжительных периодов времени в значительном диапазоне температур без присутствия какого-либо значительного количества примесей/продуктов

разложения. Настоящее изобретение также относится к экономически жизнеспособному и масштабируемому процессу лиофилизации для получения стабильной при хранении композиции пегаспаргазы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1 представляет структуру лепешки для композиций в объеме настоящего изобретения.

Фиг. 2 представляет аналитические данные, демонстрирующие целостность и чистоту пегаспаргазы до и после лиофилизации (фиг. 2(B)) по оценке с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого разрешения (SE-HPLC) соответственно.

Фиг. 3 представляет аналитические данные, полученные с помощью электрофореза додецилсульфат натрия в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), сравнивающие стабильность известной жидкой композиции пегаспаргазы (Фиг.3(A)) с лиофилизированной композицией по настоящему изобретению (Фиг.3(B)).

Фиг. 4 представляет аналитические данные, полученные с помощью электрофореза додецилсульфат натрия в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), демонстрирующие присутствие высокомолекулярных примесей, присутствующих в лиофилизированной композиции пегаспаргазы предшествующего уровня техники с лиофилизированной композицией настоящего изобретения путем окрашивания Кумасси (Фиг. 4(A)), окрашивание йодом (фиг. 4(B)). На Фиг.4(C) и Фиг.4(D) показан Вестерн-блот-анализ образцов против антител против аспарагического и против PEG, соответственно.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

КОМПОЗИЦИЯ

Согласно настоящему изобретению созданы оптимальная стабильная при хранении лиофилизированная композиция, содержащая пегаспаргазу, которая проявляет физико-химическую стабильность и биологическую активность в течение срока ее хранения, и процесс лиофилизации для такой композиции.

Льофилизированная композиция по настоящему изобретению включает в качестве активного ингредиента пегаспаргазу. Льофилизированная композиция по настоящему изобретению включает пегаспаргазу, криопротектор, наполнитель, буфер и может по выбору содержать другие фармацевтически приемлемые

вспомогательные вещества, включая, но не ограничиваясь ими, соль.

Лиофилизированная композиция по настоящему изобретению включает пегилированную аспарагиназу, содержащую полиалкиленоксидную группу, ковалентно связанную линкером с аспарагиназой.

Композиция по настоящему изобретению относится к пегилированной аспарагиназе. Пегилированная аспарагиназа, также известная как пегаспаргаза, включает моно-метоксиполиэтиленгликоль (mPEG) с молекулярной массой, предпочтительно, от 4 до 6 кДа, более предпочтительно, от 4,5 до 5,5 кДа и, наиболее предпочтительно, от 4,8 до 5,2 кДа, который ковалентно связан сукцинатным линкером через амидную связь с одной или несколькими первичными аминогруппами (концевым амином и α -аминокислотой боковой цепи лизина) L-аспарагиназы.

L-аспарагиназа может быть получена естественным путем из *E.coli* или других бактериальных источников, таких как *Erwinia chrysanthemi*, или путем генной инженерии в *E.coli* с помощью рекомбинантной технологии.

Реакция конъюгации mPEG и L-аспарагиназы приводит к ковалентному присоединению 1-12 mPEG на мономер L-аспарагиназы, предпочтительно, между 5-10 mPEG на мономер L-аспарагиназы, более предпочтительно, между 7-10 mPEG на мономер L-аспарагиназы и, наиболее предпочтительно, 7-9 mPEG на мономер L-аспарагиназы.

Количество пегаспаргазы по изобретению может присутствовать в концентрации (общий весовой процент) от 2 до 32% от композиции; более предпочтительно, 5-20% и, наиболее предпочтительно, 6-14%.

Описанный здесь процесс лиофилизации является новым и изобретательным с точки зрения оптимального количества вспомогательных веществ, используемых в процессе. Вспомогательные вещества по настоящему изобретению придают композиции по настоящему изобретению физико-химическую стабильность и биологическую активность в течение срока хранения. Вспомогательные вещества также позволяют разработать короткий и экономичный цикл лиофилизации для получения продукта по настоящему изобретению. Композиция по настоящему изобретению, содержащая пегаспаргазу и вспомогательные вещества, как изложено в настоящем документе, является синергетической.

В состав настоящего изобретения входит криопротектор. Криопротектор может быть выбран из сахара, полиола, полимера и аминокислоты. Более

предпочтительно, криопротектором по настоящему изобретению является сахар. Наиболее предпочтительно, криопротектором является сахароза. Криопротектор может присутствовать в диапазоне от 9 до 91% композиции; более предпочтительно, 20-60% и, наиболее предпочтительно, 32-41% композиции по настоящему изобретению. Не ограничиваясь теорией, композиция по настоящему изобретению предусматривает криопротектор, который может служить как крио, так и лиопротектором для уменьшения нагрузки вспомогательных веществ во время цикла. Он также может служить стабилизатором.

Композиция по настоящему изобретению включает наполнитель. Наполнитель по настоящему изобретению выбран из группы, включающей сахар, полиол, полимер и аминокислоту, предпочтительно, наполнитель представляет собой аминокислоту, выбранную из группы, включающей глицин, гистидин, аргинин; предпочтительно, аминокислота представляет собой глицин. Наполнитель по изобретению может присутствовать в диапазоне от 1 до 78% композиции; более предпочтительно, 20-60% и, наиболее предпочтительно, 38-50% композиции по настоящему изобретению.

Композиция по настоящему изобретению включает буфер. Буфер может быть выбран из группы, включающей фосфатный буфер, такой как натрий-фосфатный буфер (дигидрофосфат натрия - гидрофосфат динатрия) или калий-фосфатный буфер (дигидрофосфат калия - гидрофосфат калия), TRIS, цитратный буфер; предпочтительно, композиция по настоящему изобретению включает фосфатный буфер. pH продукта до лиофилизации и после восстановления лиофилизированного продукта может составлять 6-8. Буфер по настоящему изобретению может присутствовать в диапазоне от 3 до 33% композиции; более предпочтительно, 3-15% и, наиболее предпочтительно, 4-6% композиции по настоящему изобретению.

Композиция по настоящему изобретению может необязательно включать соль, выбранную из группы, включающей хлорид натрия, хлорид калия, предпочтителен хлорид натрия. Количество соли в композиции может находиться в диапазоне 0-40%, предпочтительно, 0-10%, более предпочтительно, 0-0,5% композиции по настоящему изобретению. Не ограничиваясь теорией, композиция по настоящему изобретению отличается тем, что она содержит небольшое количество соли или не содержит ее, т.е. композиция по настоящему изобретению может содержать соль в очень небольшом количестве, в отличие от композиций предшествующего уровня техники, а также может не содержать соли.

Композиция по настоящему изобретению имеет осмоляльность, предпочтительно, в диапазоне 250–600 мОсм/кг, более предпочтительно 250–500 мОсм/кг и, наиболее предпочтительно, 250–450 мОсм/кг.

СПОСОБ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Утверждается, что способы лиофилизации уникальны для вспомогательных веществ и активного ингредиента, и способы должны разрабатываться отдельно для каждой композиции. Кроме того, способы в предшествующем уровне техники являются длительными, используют большое количество вспомогательных веществ и неэкономичны.

В способе лиофилизации по настоящему изобретению активный фармацевтический материал формулируется таким образом, чтобы полученный лиофилизированный продукт имел следующие характеристики:

- a. изящную лепешку, которая не прилипает к стенке флакона
- b. постоянное содержание влаги
- c. увеличенный срок хранения (при комнатной температуре)
- d. легко растворяется при восстановлении, образует прозрачный раствор.
- e. активность белка не нарушена.
- f. никаких изменений в структуре белка
- g. pH поддерживается
- h. восстановленный раствор находится в приемлемом диапазоне осмоляльности для парентерального введения.

Цикл лиофилизации состоит в основном из трех этапов: замораживания, первичной сушки и вторичной сушки с дополнительным этапом отжига между замораживанием и первичной сушкой. Каждый из этих этапов оптимизирован для композиции по настоящему изобретению. Кроме того, предполагается, что описанный здесь способ будет также применим к аналогичным композициям, содержащим пегаспаргазу в качестве активного ингредиента.

Общее время способа лиофилизации в настоящем изобретении составляет, предпочтительно, от 2880 мин (48 ч) до 5790 мин (96,5 ч), более предпочтительно, от 3120 мин (52 ч) до 4980 мин (83 ч), наиболее предпочтительно, от 3120 мин. (52 ч) до 4200 мин (70 ч). Способ лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, включает изменение температуры от -60°C до 30°C , более предпочтительно, от -50°C до 30°C , наиболее

предпочтительно, от -40°C до 25°C . Изменение давления в процессе лиофилизации в настоящем изобретении предпочтительно составляет от 0,037 до 760 торр.

ПРЕДЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Концентрация пегаспаргазы, присутствующей в композиции перед лиофилизацией, предпочтительно, находится в диапазоне 4-25%, более предпочтительно, в диапазоне 6-20%, наиболее предпочтительно, в диапазоне 8-16% от композиции.

Объем заполнения перед лиофилизацией, предпочтительно, находится в диапазоне от 0,5 до 5 мл, более предпочтительно, в диапазоне от 0,5 до 4 мл, наиболее предпочтительно, в диапазоне от 0,5 до 3 мл.

В зависимости от объема заполнения, а также объема после восстановления, необходимо добавить соответствующую концентрацию добавок (если есть), чтобы была получена желаемая концентрация добавок после восстановления лиофилизированного продукта перед его введением.

ЦИКЛ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

ЭТАП -1 - ЗАМОРАЖИВАНИЕ

Ллиофилизированный процесс в настоящем изобретении, предпочтительно, включает самую низкую температуру этапа замораживания от -10°C до -60°C , более предпочтительно, от -20°C до -50°C , наиболее предпочтительно, от -35°C до -45°C . Общее время этапа замораживания процесса лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 150 до 500 минут, более предпочтительно, от 200 до 400 минут, наиболее предпочтительно, от 240 до 350 минут. Время, необходимое для достижения самой низкой температуры замораживания этапа замораживания процесса лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 20 минут до 180 минут, более предпочтительно, от 30 минут до 120 минут, наиболее предпочтительно, от 45 минут до 90 минут. Время выдержки при самой низкой температуре замораживания этапа замораживания процесса лиофилизации в настоящем изобретении составляет, предпочтительно, от 120 мин до 480 мин, более предпочтительно, от 250 мин до 360 мин, наиболее предпочтительно, от 200 мин до 300 мин.

ЭТАП - 2 - ПЕРВИЧНАЯ СУШКА

Ллиофилизированный процесс в настоящем изобретении, предпочтительно, включает начальную температуру этапа первичной сушки от 10°C до -50°C , более

предпочтительно, от 0°C до -45°C, наиболее предпочтительно, от -30°C до -40°C. Общее время этапа первичной сушки процесса лиофилизации в настоящем изобретении составляет, предпочтительно, от 35 до 80 часов, более предпочтительно, от 40 до 75 часов, наиболее предпочтительно, от 50 до 60 часов. Время, необходимое для достижения начальной температуры этапа первичной сушки процесса лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 100 до 1000 минут, более предпочтительно, от 250 до 500 минут, наиболее предпочтительно, от 300 до 400 минут. Давление в начале этапа первичной сушки процесса лиофилизации по настоящему изобретению предпочтительно составляет от 50 до 200 мТорр. Максимальная температура в конце этапа первичной сушки процесса лиофилизации по настоящему изобретению, предпочтительно, составляет от 5°C до 25°C, более предпочтительно, от 8°C до 22°C, наиболее предпочтительно, от 10°C до 20°C. Время выдержки при максимальной температуре этапа первичной сушки процесса лиофилизации в настоящем изобретении составляет, предпочтительно, от 5 до 72 часов, более предпочтительно, от 8 до 24 часов, наиболее предпочтительно, от 10 до 14 часов. Давление в конце этапа первичной сушки процесса лиофилизации в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, составляет от 37 до 112 мторр, более предпочтительно, от 50 до 90 мторр, наиболее предпочтительно, от 60 до 80 мторр.

Этап первичной сушки процесса лиофилизации в настоящем изобретении может также включать один или более промежуточных этапов сушки. Температура промежуточного этапа сушки процесса лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от -5°C до 15°C, более предпочтительно, от 0°C до 10°C, наиболее предпочтительно, от 3°C до 7°C. Время выдержки на промежуточном этапе сушки процесса лиофилизации по настоящему изобретению, предпочтительно, составляет от 2 до 24 часов, более предпочтительно, от 5 до 12 часов, наиболее предпочтительно, от 8 до 10 часов. Давление на промежуточном этапе сушки в процессе лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 75 мТорр до 200 мТорр, наиболее предпочтительно, от 100 мТорр до 120 мТорр.

ЭТАП - 3 - ВТОРИЧНАЯ СУШКА

В конце цикла первичной сушки высушенный порошок обычно сохраняет 10% влаги, которую необходимо удалить путем включения вторичного цикла. Это

последний цикл способа лиофилизации, в котором удаляется незамерзшая вода, то есть вода, связанная с аморфным состоянием, для дальнейшей сушки продукта и снижения остаточного содержания влаги.

Способ лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, включает температуру этапа вторичной сушки от 10°C до 37°C, более предпочтительно, от 15°C до 35°C, наиболее предпочтительно, от 20°C до 30°C. Общее время этапа вторичной сушки способа лиофилизации в настоящем изобретении составляет, предпочтительно, от 3 до 24 часов, более предпочтительно, от 4 до 16 часов, наиболее предпочтительно, от 4 до 7 часов. Время выдержки на этапе вторичной сушки способа лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 3 до 24 часов, более предпочтительно, от 4 до 16 часов, наиболее предпочтительно, от 4 до 7 часов. Давление на этапе вторичной сушки способа лиофилизации в настоящем изобретении, предпочтительно, составляет от 37 мторр до 50 мторр.

ПОСТЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Объем восстановления на флакон после лиофилизации может составлять 1-5,5 мл, в зависимости от желаемой дозы после восстановления и начальной концентрации пробы перед лиофилизацией. Концентрация пегаспаргазы после восстановления лиофилизированного продукта в необходимом объеме находится в диапазоне $750 \pm 20\%$ МЕ/мл.

ПОЛЕЗНОСТЬ

В другом аспекте изобретения наблюдается, что композиция по настоящему изобретению стабильна в течение продолжительных периодов времени, несмотря на колебания температуры, которые происходят во время обработки и транспортировки, поскольку продукт стабилен при комнатной температуре, а также при 30°C и 37°C для значительного промежутка времени. Не ограничиваясь теорией, предполагается, что оптимальное использование различных ингредиентов в указанном соотношении поддерживает стабильность композиции во время и после лиофилизации с получением более стабильного продукта. Композиция по настоящему изобретению позволяет получить лиофилизированный продукт, который сохраняет физическую целостность, биологическую активность и химическую стабильность.

Кроме того, композиция по настоящему изобретению содержит пегаспаргазу, чистота которой после лиофилизации превышает 95%. При такой более

высокой процентной чистоте композиция хорошо стабилизируется, и обнаруживается минимальное ухудшение как в ускоренных, так и в реальных условиях стабильности.

Композиция по настоящему изобретению также является синергической в том, что ингредиенты, когда они составлены вместе в соответствии с принципами, описанными здесь, дают композицию, обладающую соответствующей активностью и стабильностью в течение срока ее хранения.

ПРЕИМУЩЕСТВА КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция по настоящему изобретению такова, что она обеспечивает желаемую механическую поддержку структуры лепешки, тем самым придавая стабильность композиции пегаспаргазы и повышая ее способность выдерживать стресс процесса лиофилизации, что приводит к стабильному при хранении продукту.

2. Способ по настоящему изобретению таков, что время лиофилизации значительно сокращается по сравнению с другими способами предшествующего уровня техники, тем самым открывая путь к экономически жизнеспособному способу с почти 2-дневным сокращением времени работы лиофилизатора и использования оборудования. Процесс лиофилизации, оптимизированный для новой композиции пегаспаргазы, как подробно описано в данном изобретении, завершается менее, чем за 3 дня, что является заметным улучшением по сравнению со способом лиофилизации почти за 5 дней (112,5 часов).

3. Композиция по настоящему изобретению позволяет использовать в составе лиофилизированной пегаспаргазы отсутствие соли или ее низкую концентрацию, обеспечивая преимущества с точки зрения температуры эвтектики и стеклования.

4. Новая композиция, упомянутая в настоящем изобретении, дает стабильный при хранении продукт даже при более высокой температуре. Стабильность лиофилизированной пегаспаргазы при 30°C в течение 18 месяцев и 37°C в течение 3 месяцев ясно демонстрирует улучшение термостабильности по сравнению с жидким составом. Физическое, химическое и биологическое разрушение рассматриваемой композиции сводится к минимуму как при ускоренных условиях хранения, так и в условиях хранения в реальном времени. Это особенно важно для развивающихся стран, поскольку эта новая композиция лиофилизированной пегаспаргазы допускает скачки температуры во время

транспортировки и погрузочно-разгрузочных работ.

5. Композиция лиофилизированной пегаспаргазы в настоящем изобретении была разработана совместно со способом лиофилизации, тем самым снижая нагрузку на продукт в условиях лиофилизации. Высокая процентная чистота пегаспаргазы в новой композиции и отсутствие деградированного продукта, который часто образуется в результате стресса, вызванного процессом лиофилизации белка, делает продукт менее иммуногенным (из-за наличия примесей, связанных с продуктом – в основном деградированные продукты). Кроме того, настоящее изобретение не приводит к какой-либо вызванной стрессом агрегации, приводящей к образованию более высокомолекулярных видов, как это наблюдалось в случае других продуктов предшествующего уровня техники; при анализе с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Следует отметить, что жидкая композиция продукта предшествующего уровня техники не показывала присутствие частиц с более высокой молекулярной массой. Новая композиция лиофилизированной пегаспаргазы, разработанная с использованием нового способа лиофилизации, подходящего для композиции, подробно описанной в настоящем изобретении, не содержит каких-либо соединений с более высокой молекулярной массой.

6. Основываясь на оптимальном количестве вспомогательных веществ и оптимизированном способе лиофилизации, настоящее изобретение приводит к стабильному при хранении лиофилизированному продукту с оптимальной стоимостью.

Настоящее изобретение проиллюстрировано здесь примерами. Примеры обеспечивают описание композиции по настоящему изобретению и защиту пегаспаргазы во время лиофилизации и хранения. Примеры являются иллюстрацией одного варианта осуществления настоящего изобретения и никоим образом не могут быть истолкованы как ограничивающие.

ПРИМЕРЫ

Как было повторено ранее, цикл лиофилизации и композиция должны разрабатываться совместно, поскольку процесс лиофилизации, дающий стабильный при хранении продукт, зависит от состава препарата, который, в свою очередь, определяет судьбу продукта после лиофилизации. Примеры 1 и 2 подробно описывают взаимозависимость способа лиофилизации и композиции.

ПРИМЕР 1: ВЛИЯНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА

1.1 КРИОПРОТЕКТОР

Объемный буфер пегаспаргазы заменяли на 50 мМ натрий-фосфатный буферный солевой раствор, pH 7,4. Основная масса (лекарственное вещество) была составлена с различным массовым процентом (композиции) криопротектора, а именно, сахарозы и трегалозы. 1 мл приготовленной массы пегаспаргазы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, стеклянные флаконы объемом 2 мл (рекомендованные для парентерального введения) и наполовину закрывали 13-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы закрывали наполовину пробками и подвергали способу лиофилизации.

Для этапа замораживания процесса лиофилизации начальное замораживание проводили при -40°C в течение 1 часа, что достигало скорости замораживания $1,08^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, при этом флаконы выдерживали в течение 3 часов. На этапе первичной сушки температуру доводили до -5°C со скоростью $0,028^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 6 часов. Температуру дополнительно повышали до 0°C со скоростью $0,006^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали при 0°C в течение 6 часов при давлении 112 мторр. Наконец, температуру дополнительно повышали до 20°C со скоростью $0,03^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 20°C в течение 5 часов при давлении 112 мторр. На этапа вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,17^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов. Общее время процесса лиофилизации 76,5 ч.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 13 мм и подвергали аналитическому анализу. Для лиофилизированного продукта измеряли структуру лепешки, время восстановления, прозрачность после восстановления и относительную активность (по отношению к предварительно лиофилизированному образцу). Результаты процесса лиофилизации различных композиций пегаспаргазы с различными криозащитными средствами представлены в таблице 1.

Таблица 1: ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ С РАЗЛИЧНЫМ ПРОЦЕНТНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ В СОСТАВЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ КОМПОЗИЦИИ ПЕГАСПАРГАЗЫ

№.	Криопротектор	% композиции	Внешность лепешки	Время восстановления	Прозрачность после восстановления	Относительный % активности
1	Сахароза	35,14%	Плохая:	30 сек.	ясно	89%
2		69,80%	Плохая	30 сек.	ясно	82%
3		90,24%	Плохая	35 сек	ясно	86%
4	Трегалоза	31,62%	Плохая	27 сек	ясно	93%
5		90,24%	Плохая	1:45 мин	ясно	80%
6	Сахароза	55,84%	Плохая	32 сек	ясно	95%
	Трегалоза	13,96%				

Структура лепешки всей приготовленной пегаспаргазы в присутствии различных криопротекторов с различным процентным содержанием лиофилизированного продукта была неудовлетворительной. Таким образом, для получения удовлетворительного результата требовалось добавление наполнителя.

1.2. НАПОЛНИТЕЛЬ

Объемный буфер пегаспаргазы заменяли на 50 мМ натрий-фосфатный буферный солевой раствор, pH 7,4. Основная масса (лекарственная субстанция), приготовленная с различным массовым процентным содержанием (композиции) наполнителей, а именно, маннит и глицин. 1 мл приготовленной массы пегаспаргазы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, стеклянные флаконы объемом 2 мл (рекомендованные для парентерального введения) и наполовину закрывали 13-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы закрывали наполовину пробками и подвергали процессу лиофилизации.

Для этапа замораживания процесса лиофилизации начальное замораживание проводили при -40°C в течение 1 часа, что достигало скорости замораживания $1,08^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, при этом флаконы выдерживали в течение 3 часов. На этапе первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью

0,028°C/мин при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью 0,11°C/мин и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, температуру дополнительно повышали до 15°C со скоростью 0,13°C/мин и поддерживали на уровне 15°C в течение 12 часов при пониженном давлении 75 мТорр. На этапа вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью 0,33°C/мин и поддерживали в течение 5 часов. Общее время способа лиофилизации – 53 часа.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 13 мм и подвергали аналитическому анализу. Для лиофилизированного продукта измеряли структуру осадка, время восстановления, прозрачность после восстановления, а также относительную активность и чистоту (по отношению к предварительно лиофилизированному образцу). Результат процесса лиофилизации различных композиций пегаспаргазы с различным наполнителем представлен в таблице 2.

Таблица 2: ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ПРОЦЕНТНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ В СОСТАВЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ КОМПОЗИЦИИ ПЕГАСПАРГАЗЫ

№.	Наполнитель	% композиции	Внешность лепешки	Восстановление Время	Прозрачность после восстановления	% активности	Относительный % чистоты
1	Нет	нд	Хорошая	28 сек	ясно	69%	67%
2	Глицин	51,54%	Хорошая	26 сек	ясно	83%	98%
3	Глицин	51,36%	Хорошая	52 сек	ясно	100%	96%
4	Маннитол	35,96%	Плохая	37 сек	ясно	89%	97%
5	Маннитол	27,44%	Плохая	37 сек	ясно	83%	99%
	Глицин	24,01%					

Структура лепешки представлена на фиг. 1. Из набора данных ясно, что наполнитель глицин вносит существенный вклад в структуру лепешки, а также сохраняет активность в допустимых пределах (от 600 МЕ/мл до 900 МЕ/мл). Структура лепешки в отсутствие наполнителя для этого процесса лиофилизации является фармацевтически приемлемой, но активность и чистота пегаспаргазы очень низки. Использование маннита в качестве наполнителя, хотя и сохраняет активность и чистоту, не показывает хорошую структуру лепешки для этого способа лиофилизации.

1.3. ДЕЙСТВИЕ СОЛИ

Основная масса пегаспаргазы была заменена буфером в 50 мМ натрий-фосфатном буферном солевом растворе, pH 7,4 и приготовлена с сахарозой (крио/лио-протектором), различными количествами наполнителя - глицина с различным количеством (мас.% композиции) соли. 2 мл приготовленной массы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, стеклянные флаконы объемом 5 мл (рекомендованные для парентерального введения) и закрывали на половину пробкой 20-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы закрывали наполовину пробками и подвергали оптимизированному способу лиофилизации.

Этап замораживания способа лиофилизации проводили при -40°C в течение 4 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. На этапе первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью $0,014^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,06^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Давление снижали до 75 мторр, температуру доводили до 15°C со скоростью $0,02^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 12 часов. Во время цикла вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем

лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 20 мм. Лيوфилизированный продукт восстанавливали в 5 мл воды для инъекций и подвергали аналитическому анализу. Структура осадка, время восстановления, прозрачность после восстановления, относительная активность (относительно массы до лиофилизации), абсолютная чистота (выраженная в процентах, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с исключением размера (SE-HPLC)) и осмоляльность были измерены для лиофилизированного продукта. Результаты способа лиофилизации различных композиций пегаспаргазы представлены в таблице 3.

Таблица 3: ВЛИЯНИЕ NaCl И ГЛИЦИНА НА ЛИОФИЛИЗАЦИЮ ПЕГАСПАРГАЗА

№.	% композиции		Внешность лепешки	Время восстановления (сек)	Прозрачность после восстановления	% активности	% чистоты	Осмоляльность (мОсм/кг)
	NaCl	Глицин						
1	0,00%	48,44%	Хорошая	40	ясно	90,0%	98,0%	427
2	0,00%	46,45%	Хорошая	39	ясно	90,7%	97,7%	393
3	0,00%	44,29%	Хорошая	42	ясно	80,8%	нет данных.	370
4	0,44%	48,23%	Хорошая	44	ясно	92,6%	97,6%	427
5	0,45%	46,24%	Хорошая	35	ясно	96,8%	98,2%	395
6	0,47%	44,08%	Хорошая	30	ясно	93,9%	97,9%	385
7	1,08%	47,92%	Хорошая	35	ясно	85,3%	97,6%	433
8	1,12%	45,93%	Хорошо	33	ясно	87,8%	97,6%	403
9	1,16%	43,78%	Хорошо	32	ясно	61,9%	нет данных.	384

Очевидно, что оптимизированный способ лиофилизации можно использовать для композиции с низкой концентрацией соли или без нее без изменения критических характеристик продукта.

Пример 2: ВЛИЯНИЕ РАЗНОГО ЦИКЛА ЛИОФИЛИЗАЦИИ НА ОДНУ И ТУ ЖЕ КОМПОЗИЦИЮ

Основную массу пегаспаргазы заменяли буфером в 50 мМ натрий-фосфатном буферном физиологическом растворе, pH 7,4. Основная масса (лекарственное вещество) была приготовлена с сахарозой (крио/лио-протектором в количестве 34,3% композиции) и глицином (наполнителем в количестве 51,5% композиции). 1 мл приготовленной массы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, 2 мл стеклянные флаконы (рекомендованные для парентерального введения) и наполовину закрывали 13-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы закрывали наполовину пробками и подвергали различным способам лиофилизации.

Этап замораживания в различных процессах лиофилизации проводился в течение разной продолжительности и температуры. В некоторых случаях выполнялось одностадийное замораживание, в других – многоступенчатое. За один цикл начальное замораживание проводили при -15°C в течение 2 часов, при этом скорость замораживания составляла $1,16^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. За этим последовало дальнейшее снижение температуры до -25°C , достигнутое при скорости замораживания $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, когда флаконы выдерживали в течение 3 часов. Наконец, температура была снижена до -40°C , что было достигнуто при скорости замораживания $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, когда флаконы выдерживали в течение 2 часов. Общая продолжительность этапа замораживания составила 8,5 ч. В другом цикле этап замораживания способа лиофилизации проводили при -40°C в течение 3 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Общая продолжительность этапа замораживания составляла 4 ч. В другом цикле этап замораживания способа лиофилизации проводили при -40°C в течение 6 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Общая продолжительность этапа замораживания составила 8 ч. Тем не менее, в другом цикле этап замораживания процесса лиофилизации проводили при -40°C в течение 4 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Общая продолжительность этапа замораживания составляла 5 ч.

Этап первичной сушки цикла лиофилизации также варьировался в

зависимости от температуры, давления и времени. В одном цикле, на этапе первичной сушки, температуру доводили до -5°C со скоростью $0,028^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 6 часов. Температуру дополнительно повышали до 0°C со скоростью $0,006^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали при 0°C в течение 6 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, температуру дополнительно повышали до 20°C со скоростью $0,03^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 20°C в течение 5 часов при давлении 112 мТорр. Общая продолжительность этапа первичной сушки составила 61,5 ч. В другом цикле для этапа первичной сушки температуру доводили до -5°C со скоростью $0,15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 14 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,06^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, давление снижали до 75 мТорр, а температуру доводили до 15°C со скоростью $0,067^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 6 часов. Общая продолжительность этапа первичной сушки составила 38,5 ч. В другом цикле для этапа первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью $0,027^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, давление снижали до 75 мТорр, а температуру доводили до 15°C со скоростью $0,067^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 12 часов. Общая продолжительность этапа первичной сушки составила 42,5 часа. В другом цикле для этапа первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью $0,027^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,11^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Температуру дополнительно повышали до 10°C со скоростью $0,014^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 10°C в течение 24 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, давление снижали до 75 мТорр, а температуру доводили до 15°C со скоростью $0,033^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 12 часов. Общая продолжительность этапа первичной сушки составила 72,5 часа. Тем не менее, в другом цикле для

этапа первичной сушки температура была доведена до -35°C со скоростью $0,027^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдержана при этой температуре в течение 6 часов. Температуру дополнительно повышали до 15°C со скоростью $0,138^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 15°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Наконец, давление снижали до 75 мТорр в течение 5 часов при 15°C и поддерживали в течение 12 часов. Общая продолжительность этапа первичной сушки составила 38,5 ч.

Этап вторичной сушки цикла лиофилизации также варьировался в зависимости от температуры, давления и времени. В одном цикле для этапа вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,16^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов. Общая продолжительность этапа вторичной сушки составляла 5,5 ч. В одном цикле для этапа вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов. Общая продолжительность этапа вторичной сушки составляла 5,5 ч. Тем не менее, в одном цикле для этапа вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 9 часов. Общая продолжительность этапа вторичной сушки составила 9,5 ч.

Время завершения процесса лиофилизации варьировало от 48 до 83,5 часов.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 13 мм и подвергали аналитическому анализу. Структура осадка, время восстановления, прозрачность после восстановления, относительная активность (по отношению к массе до лиофилизации), относительная чистота (относительно массы до лиофилизации, как определено с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения с вытеснением по размеру (SE-HPLC)) и осмоляльность измерены для лиофилизированного продукта. Лيوфилизированный продукт имел образование лепешки от хорошего до удовлетворительного, приемлемое время восстановления (менее 2 минут),

а восстановленный образец был прозрачным и бесцветным. Однако относительная активность и чистота значительно варьировались, как показано в Таблице 4. Такой результат ожидается из-за различных стрессовых условий, создаваемых одной и той же композиции из-за изменения процесса лиофилизации.

Таблица 4: ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ЧИСТОТА И АКТИВНОСТЬ ОДНОГО И ТОГО ЖЕ ПРЕПАРАТА С РАЗЛИЧНЫМИ УСЛОВИЯМИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Циклы лиофилизации	Время (час.)				Относитель ный % активности	Относительный % чистоты
	Заморажива ние	Первичная сушка	Вторичная сушка	Общее		
1	8,5	61,5	5,5	75,5	84%	83%
2	4,0	61,5	5,5	71,0	98%	91%
3	4,0	38,5	5,5	48,0	91%	93%
4	8,0	38,5	5,5	52,0	87%	91%
5	5,0	42,5	5,5	53,0	83%	98%
6	5,0	61,5	5,5	72,0	87%	101%
7	5,0	38,5	9,5	53,0	85%	95%

Пример 3: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ ПРИМЕР КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ – НИЗКАЯ СОЛЬ.

Основную массу пегаспаргазы заменяли буфером в 50 мМ натрийфосфатном буферном физиологическом растворе, pH 7,4. Требуемый объем составляли с сахарозой в качестве крио/лио-защитного средства и глицином в качестве наполнителя и, наконец, разбавляли до 1875 МЕ/мл. Конечный состав состоял из пегаспаргазы, сахарозы, глицина, одноосновного фосфата натрия, двухосновного фосфата натрия и хлорида натрия в количестве от 13,67% до 7,04%, от 39,60% до 36,78%, от 47,52% до 44,13%, от 0,95% до 0,88%, от 4,42% до 4,10%. % и от 0,47% до 0,43% композиции соответственно. 2 мл приготовленной массы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, стеклянные флаконы объемом 5 мл (рекомендованные для парентерального введения) и закрывали на половину пробкой 20-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы

закрывали наполовину пробками и подвергали оптимизированному процессу лиофилизации.

Этап замораживания способа лиофилизации проводили при -40°C в течение 4 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В цикле первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью $0,014^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,06^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Давление снижали до 75 мторр, температуру доводили до 15°C со скоростью $0,02^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 12 часов. Во время цикла вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов. Общее время процесса лиофилизации 66,5 ч.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 20 мм. Лيوфилизированный продукт восстанавливали в 5 мл воды для инъекций и подвергали аналитическому анализу (таблица 5).

Таблица 5. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИОФИЛИЗОВАННОГО ПЕГАСПАРГАЗА

Тест	Критерии приемлемости	Лيوфилизированный продукт
Появление	Предварительное восстановление – лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует
	Пост-восстановление - Бесцветный раствор	
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	68
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует
Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл
pH	7.0-7.4	7,08
Потенция (активность)	600-900 МЕ/мл	680
Удельная активность	≥ 85 МЕ/мг белка	128

Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегаты	94,94%
Относительная чистота		99,11%
Концентрация белка	4,8-8,5 мг/мл	5,33
Содержание влаги	Не более 5%	3,5%
Осмоляльность (мОсм / кг)	270-600 мОсм/кг	409

На Фиг. 2 показана целостность и чистота пред- и пост-лиофилизированной пегаспаргазы, как определено электрофорезом в додецилсульфат-полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и эксклюзионной жидкостной хроматографией высокого разрешения (SE-HPLC) соответственно.

Устойчивость процесса цикла лиофилизации, а также состав проверяли на нескольких партиях. Структура осадка, время восстановления, прозрачность после восстановления, абсолютная активность, относительная активность (относительно массы до лиофилизации), абсолютная чистота (выраженная в процентах, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с вытеснением по размеру (SE-HPLC)), относительная чистота (относительно массы до лиофилизации), осмоляльность и содержание влаги измеряли для лиофилизированного продукта. Характеристики продукта соответствуют критериям приемки, показанным в ТАБЛИЦЕ 6 для трех репрезентативных партий.

**Таблица 6. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕХ ПАРТИЙ
ЛИОФИЛИЗОВАННОЙ ПЕГАСПАРГАЗЫ**

Тест	Критерии приемлемости	Партия 1	Партия 2	Партия 3
Появление	Предварительное восстановление - лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует		
	Пост-восстановление - Бесцветный раствор			
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	59	59	66
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует		
Потенция (активность)	600-900 МЕ / мл	815	869	727

Относительная активность	НЛТ 85%	103,70%	101,60%	97,60%
Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегатов	97,55%	99,73%	99,78%
Относительная чистота		100,40%	100,00%	100,00%
Содержание влаги	Не более 5%	2,28%	2,78%	2,35%
Осмоляльность (мОсм / кг)	270-600 мОсм/кг	390	398	401

Лиофилизированный продукт подвергали долгосрочному исследованию стабильности при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 24 месяцев и ускоренному исследованию стабильности при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ относительной влажности в течение 6 месяцев в соответствии с рекомендациями ICH по качеству (Q1A). Результаты процесса лиофилизации продукта пегаспаргазы в различные моменты времени при температуре окружающей среды ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) и при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ относительной влажности приведены в таблице 7 и таблице 8 соответственно.

Таблица 7. ДОЛГОСРОЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИРОВАННОЙ ПЕГАСПАРГАЗЫ ПРИ $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ В ТЕЧЕНИЕ 24 МЕСЯЦЕВ.

Тест	Критерии приемлемости	0 дней	15 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев	12 месяцев	18 месяцев	24 месяца
Появление	Предварительное восстановление - лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует								
	После восстановления - Бесцветный раствор									
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	68	58	58	52	58	59	59	57	54
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует								
Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл

рН	7,0-7,4	7,0 8	7,0 9	7,11	7,07	7,08	7,2	7,19	7,17	7,2
Потенция (активность)	600-900 МЕ/мл	680	687	679	673	661	650	656	675	642
Удельная активность	≥ 85 МЕ/мг белка	128	128	126	130	127	115	120	121	123
Чистота SEC	$\geq 85\%$ активны компоненты, $\leq$ 8% агрегатов	94, 94 %	95, 96 %	95,8 6%	95,82 %	95,77 %	95,70 %	95,79 %	95,40 %	93,05 %
Относительная чистота		99, 11 %	100 ,18 %	100, 07%	100,0 3%	99,98 %	99,91 %	100,00 %	99,59 %	97,14 %
Концентрация п белка	4,8-8,5 мг / мл	5,3 3	5,3 5	5,39	5,18	5,2	5,66	5,48	5,58	5,24
Осмоляльность (мОсм/ кг) п	270-600 мОсм/кг	409	419	412	411	413	406	411	408	413

Таблица 8. УСКОРЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИРОВАННОЙ ПЕГАСПАРГАЗЫ ПРИ $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ /ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЛАЖНОСТИ $60\% \pm 5\%$ В ТЕЧЕНИИ 6 МЕСЯЦЕВ.

Тест	Критерии приемлемости	0 дней	15 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяцев
Появление	Предварительное восстановление - От белой к не белой лепешке	Соответствует				
	После восстановления - Бесцветный раствор					
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	68	64	63	56	62
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует				
Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
рН	7,0-7,4	7,08	7,1	7,1	7,06	7,05
Потенция (активность)	600-900 МЕ/мл	680	679	681	657	622

Удельная активность	≥ 85 МЕ/мг белка	128	129	132	123	119
Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегатов	94.94%	95.53%	95.00%	95.09%	94.06%
Относительная чистота		99.11%	99.73%	99.18%	99.27%	98.19%
Концентрация белка	4,8-8,5 мг / мл	5.33	5.28	5.14	5.33	5.24
Осмоляльность (мОсм/кг)	270-600 мОсм / кг	409	412	414	411	410

Характеристики продукта соответствуют критериям приемлемости в течение всего срока, показывающим, что продукт стабилен при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 24 месяцев и при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\%$ относительной влажности в течение 6 месяцев. Кроме того, стабильность лиофилизированного продукта оценивали при повышенной температуре, для которой продукт подвергали долгосрочному исследованию стабильности при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \pm 5\%$ относительной влажности в течение 18 месяцев и ускоренному исследованию стабильности при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / \text{относительная влажность } 75\% \pm 5\%$ в течение 3 месяцев. Результат процесса лиофилизации продукта пегаспаргазы в различные моменты времени при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \pm 5\%$ относительной влажности и при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\%$ относительной влажности сведен в таблицу в Таблице 9 и Таблице 10, соответственно. Характеристики продукта соответствуют критериям приемлемости в течение всего периода времени, показывающим, что продукт стабилен при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \pm 5\%$ относительной влажности в течение 18 месяцев и при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\%$ относительной влажности в течение 3 месяцев.

Таблица 9. ДОЛГОСРОЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИРОВАННОЙ ПЕГАСПАРГАЗЫ ПРИ $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЛАЖНОСТИ $65\% \pm 5\%$ В ТЕЧЕНИЕ 18 МЕСЯЦЕВ

Тест	Критерии приемлемости	0 дней	15 дней	1 Месяц	3 Месяца	6 Месяцев	9 Месяцев	12 Месяцев	18 Месяцев
------	-----------------------	--------	---------	---------	----------	-----------	-----------	------------	------------

Появление	Предварительное восстановление - лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует							
	После восстановления - Бесцветный раствор								
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	68	57	59	58	61	58	62	61
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует							
Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
pH	7,0-7,4	7,08	7,08	7,09	7,07	7,05	7,27	7,18	7,24
Потенция (активность)	600-900 МЕ/мл	680	668	687	652	611	617	629	601
Удельная активность	≥85 МЕ / мг белка	128	131	138	128	119	116	112	113
Чистота SEC	≥85% активных компонентов, ≤8% агрегатов	94,94 %	95,31 %	95,00%	94,11%	91,11%	90,10%	91,00%	87,06%
Относительная чистота		99,11 %	99,50 %	99,18%	98,25%	95,11%	94,06%	95,00%	90,89%
Концентрация белка	4,8-8,5 мг / мл	5,33	5,11	4,98	5,08	5,15	5,33	5,61	5,3
Осмоляльность (мОсм/кг)	270-600 мОсм/кг	409	411	415	406	409	396	409	412

Таблица 10. УСКОРЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИРОВАННОЙ ПЕГАСПАРГАЗЫ ПРИ 37°С ± 2°С/ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВЛАЖНОСТИ 75% ± 5% В ТЕЧЕНИИ 3 МЕСЯЦЕВ.

Тест	Критерии приемственности	0 дней	15 дней	1 Месяц	3 месяца
Появление	Предварительное восстановление – лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует			
	Пост-восстановление - Бесцветный раствор				
Время восстановления	Не более 180 секунд	68	56	54	59
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует			
Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл	5,0 мл
рН	7,0-7,4	7,08	7,9	7,09	7,1
Потенция (активность)	600-900 МЕ / мл	680	656	699	631
Удельная активность	≥ 85 МЕ / мг белка	128	125	130	125
Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегатов	94,94%	91,16%	91,15%	90,26%
Относительная чистота		99,11%	95,17%	95,16%	94,23%
Протеин Концентрация	4,8-8,5 мг/мл	5,33	5,24	5,37	5,05
Осмоляльность (мОсм/кг)	270-600 мОсм/кг	409	411	419	410

Пример 4: ИЛЛЮСТРАТИВНЫЙ ПРИМЕР КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ – БЕЗ СОЛИ

Объемный буфер пегаспаргазы заменяли на 50 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7,4. Требуемую концентрированную массу составляли с сахарозой в качестве крио/лио-защитного средства и глицином в качестве наполнителя и, наконец, разбавляли до 1875 МЕ/мл. Конечный состав состоял из пегаспаргазы, сахарозы, глицина, одноосновного фосфата натрия и двухосновного фосфата натрия в количестве от 12,57% до 9,60%, от 38,71% до 37,43%, от 46,45% до 44,92%, от 0,93% до 0,90% и от 4,32% до 4,18% композиции, соответственно. 2 мл приготовленной массы помещали в предварительно стерилизованные депирогенизированные USP типа I, стеклянные флаконы объемом 5 мл (рекомендованные для

парентерального введения) и закрывали на половину пробкой 20-миллиметровой серой резиновой пробкой, покрытой бромбутилом. Флаконы закрывали наполовину пробками и подвергали оптимизированному процессу лиофилизации.

Стадию замораживания процесса лиофилизации проводили при -40°C в течение 4 часов. Температура замерзания достигалась при скорости замерзания $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В цикле первичной сушки температуру доводили до -35°C со скоростью $0,014^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ при давлении 112 мТорр и выдерживали при этой температуре в течение 10 часов. Температуру дополнительно повышали до 5°C со скоростью $0,06^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали на уровне 5°C в течение 9 часов при давлении 112 мТорр. Давление снижали до 75 мТорр, температуру доводили до 15°C со скоростью $0,02^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 12 часов. Во время цикла вторичной сушки давление дополнительно снижали до 37 мТорр, а температуру повышали до 25°C со скоростью $0,33^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и поддерживали в течение 5 часов. Общее время процесса лиофилизации 66,5 ч.

После завершения процесса лиофилизации флаконы полностью закрывали пробкой, перемещая полку вверх. Затем давление сбрасывали, вводя стерильный газообразный азот в камеру лиофилизации. Затем лиофилизированные флаконы закрывали откидными крышками 20 мм. Лيوфилизированный продукт восстанавливали в 5 мл воды для инъекций и подвергали аналитическому анализу (Таблица 11).

Таблица 11. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ ПЕГАСПАРГАЗ В КАЧЕСТВЕ СОСТАВАКОМПОЗИЦИИ БЕЗ СОЛИ

Тест	Критерии приемлемости	Лيوфилизированный продукт
Появление	Предварительное восстановление - лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует
	Пост-восстановление - Бесцветный раствор	
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	49
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует

Объем заполнения	Для доставки 5,0 мл (USP)	5,0 мл
Потенция (активность)	600-900 МЕ/мл	803
Удельная активность	≥ 85 МЕ / мг белка	144
Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегатов	99,0%
Относительная чистота		100%
Концентрация белка	4,8-8,5 мг / мл	5,56
Содержание влаги	Не более 5%	2,47%
Осмоляльность (мОсм/кг)	270-600 мОсм/кг	434

Устойчивость процесса цикла лиофилизации, а также состав проверяли на нескольких партиях. Структура осадка, время восстановления, прозрачность после восстановления, абсолютная активность, относительная активность (относительно массы до лиофилизации), абсолютная чистота (выраженная в процентах, как определено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с вытеснением по размеру (SE-HPLC)), относительные чистоту (относительно массы до лиофилизации), осмоляльность и влагосодержание измеряли для лиофилизированного продукта. Характеристики продукта соответствуют критериям приемлемости, показанным в Таблице 12 для трех репрезентативных партий.

Таблица 12. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРЕХ ЛОТОВ

ЛИОФИЛИЗОВАННЫЙ ПЕГАСПАРГАЗ В КАЧЕСТВЕ СОСТАВА БЕЗ СОЛЕЙ

Тест	Критерии приемлемости	Партия 1	Партия 2	Партия 3
Появление	Предварительное восстановление - лепешка от белого до не совсем белого	Соответствует		
	Пост-восстановление – Бесцветный раствор			
Время восстановления (сек)	Не более 180 секунд	49	83	49
Ясность	Чистый, без видимых частиц	Соответствует		
Потенция (активность)	600-900 МЕ / мл	831	849	803
Относительная активность	НЛТ 85%	89%	107%	101%
Чистота по SEC	$\geq 85\%$ активных компонентов, $\leq 8\%$ агрегатов	99%	99%	99%
Относительная чистота		99%	100%	100%
Содержание влаги	Не более 5%	2,20%	2,37%	2,47%

Осмоляльность (мОсм/ кг)	270-600 мОсм/кг	420	444	434
-----------------------------	-----------------	-----	-----	-----

Лиофилизированный продукт без соли подвергали долгосрочному исследованию стабильности при $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%$ относительной влажности, при $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ относительной влажности и при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ относительной влажности, и данные представлены в Таблице 13 за один месяц и в таблице 14 за три месяца.

**Таблица 13: СТАБИЛЬНОСТЬ ВАРИАНТА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ
НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ ЗА 1 МЕСЯЦ**

Тест	Критерии приемки	0 дней	1 месяц (температура хранения)			
			5 ° C	25 ° C	30 ° C	37 ° C
Появление	Неповрежденная лепешка от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленная к флакону	Неповрежденная лепешка от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленная к флакону	Неповрежденный пирог от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленный к флакону.			
Время восстановления (с)	≤ 180 секунд	128	107	93	108	87
Ясность после восстановления	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц			
pH	с 7,1 по 7,5.	7,3	7,23	7,24	7,23	7,24
Содержание белка (мг/мл)	≥ 5 мг/мл	5,53	5,8	6,22	6,06	5,91
Анализ (МЕ/мл)	600-900 МЕ/мл	753	722	753	729	748
Удельная активность (МЕ/мг)	≥ 85 МЕ/мг	136	124	121	120	127
Осмоляльность (мОсм / кг)	Не более 460 мОсм/кг	430	434	436	439	445
Чистота по SEC (%)	$\geq 95\%$	99,63	99,95	99,99	97,76	96,83
РМТ / Общее количество частиц в	Не более 6000	Размером ≥ 10 мкм 232	45	30	30	40

контейнере	Не более 600	Размером ≥ 25 м. 020	05	03	05	03
SDS – PAGE		Приемлемо				

**Таблица 14: СТАБИЛЬНОСТЬ ВАРИАНТА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ
НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ ЗА 3 МЕСЯЦА**

Тест	Критерии приемлемости	0 дней	3 месяца (температура хранения)			
			5°C	25°C	30°C	37°C
Появление	Неповрежденная лепешка от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленная к флакону.	Неповрежденная лепешка от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленная к флакону.	Неповрежденная лепешка от белого до почти белого цвета, плотно прикрепленная к флакону.			
Время восстановления (с)	≤ 180 секунд	128	65	80	50	90
Ясность после восстановления	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц	Прозрачный раствор не должно быть видимых частиц			
pH	с 7,1 по 7.5.	7,3	7,29	7,29	7,29	7,28
Содержание белка (мг/мл)	≥ 5 мг / мл	5,53	6,21	6,12	5,56	5,66
Анализ (МЕ/мл)	600-900 МЕ/мл	753	748	719	708	763
Удельная активность (МЕ/мг)	≥ 85 МЕ / мг	136	120	116	127	135
Осмоляльность (мОсм / кг)	Не более 460 мОсм/кг	430	439	434	432	440
Чистота по SEC (%)	$\geq 95\%$	99.63	99.39	99.31	97.67	95.87
PMT / Общее количество частиц в контейнере	Не более 6000	Размером ≥ 10 мкм 232	23	23	30	73
	Не более 6000	Размером ≥ 25 мкм 020	05	03	05	03

SDS-PAGE		Приемлемо	Приемлемо
----------	--	-----------	-----------

Пример 5: СРАВНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ С ПРЕДШЕСТВУЮЩИМ УРОВНЕМ ТЕХНИКИ

5.1. ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ ПРОТИВ ТВЕРДОЙ КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пегаспаргаза, о которой сообщалось в предшествующем уровне техники, обычно представлена в виде жидкой композиции и нестабильна при хранении в течение более длительного времени и при более высокой температуре. В настоящем изобретении раскрыта лиофилизированная композиция, стабильная при хранении при различных температурах. В предшествующем уровне техники упоминается, что пегаспаргаза нестабильна в течение более длительного времени. Настоящее изобретение преодолевает это ограничение и обеспечивает стабильную при хранении композицию. Продукт предшествующего уровня техники существенно разлагается в течение 3 месяцев при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%$ относительной влажности. Как показано на Фиг.3, разложение жидкой композиции очевидно по наличию нескольких полос при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%$ относительной влажности для жидкой композиции, как было проанализировано с помощью SDS-PAGE (Фиг.3(A)). В соответствии с настоящим изобретением получают стабильную при хранении композицию, которая стабильна при $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \pm 5\%$ относительной влажности, $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \pm 5\%$ относительной влажности и при $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ относительной влажности. Стабильность настоящей композиции очевидна по наличию единственной диффузной полосы с соответствующей молекулярной массой, как показано на Фиг. 3(B).

5.2. ТВЕРДАЯ КОМПОЗИЦИЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ ПРОТИВ ТВЕРДОЙ КОМПОЗИЦИИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В предшествующем уровне техники описаны стабильные при хранении композиции, но есть ограничения в отношении агрегатов с высокой молекулярной массой в лиофилизированном продукте. В настоящем описании используется способ согласно изобретению и улучшенная композиция, и в нем отсутствуют какие-либо

дополнительные агрегации/высокомолекулярные примеси (см. Фиг. 4). На Фиг.4 показан SDS-PAGE анализ лиофилизированной композиции предшествующего уровня техники в соответствии с настоящим изобретением. Гели SDS-PAGE подтверждают присутствие высокомолекулярных примесей, о чем свидетельствует окрашивание Кумасси для белка (Фиг. 4(A)) и окрашивание йодом (Фиг. 4(B)) для PEG. Кроме того, вестерн-блоттинг с использованием антител против аспарагиназы (фиг. 4(C)) и антител против PEG (фиг. 4(B)) подтверждает присутствие примесей, связанных с продуктом. Это дополнительно подчеркивает синергетическую взаимосвязь способа лиофилизации с составом препарата. Следует отметить, что жидкая композиция продукта предшествующего уровня техники не показывала присутствие частиц с более высокой молекулярной массой.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Оптимальная стабильная при хранении лиофилизированная композиция, содержащая пегаспаргазу, криопротектор, наполнитель, буфер, по выбору с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

2. Композиция по п.1, в которой пегаспаргаза представляет собой пегилированную аспарагиназу, содержащую полиалкиленоксидную группу, ковалентно связанную линкером с аспарагиназой; в которой полиалкиленоксид представляет собой моно-метоксиполиэтиленгликоль (mPEG) с молекулярной массой, предпочтительно, от 4 до 6 кДа, более предпочтительно, от 4,5 до 5,5 кДа и, наиболее предпочтительно, от 4,8 до 5,2 кДа и ковалентно связан сукцинатным линкером через амидную связь с одной или более первичных аминогрупп L-аспарагиназы посредством конъюгации; в которой реакция конъюгации mPEG и L-аспарагиназы приводит к ковалентному присоединению 1-12 mPEG на мономер L-аспарагиназы, предпочтительно, между 5-10 mPEG на мономер L-аспарагиназы, более предпочтительно, между 7-10 mPEG на мономер L-аспарагиназы и, наиболее предпочтительно, от 7 до 9 mPEG на мономер L-аспарагиназы.

3. Композиция по п. 2, в которой L-аспарагиназа происходит из бактериального источника, выбранного из группы, состоящей из *E. coli* или *Erwinia chrysanthemi*, или получена с помощью генно-инженерной *E. coli* с помощью рекомбинантной технологии.

4. Композиция по п.1, в которой количество пегаспаргазы в композиции составляет 2-32%; более предпочтительно, 5-20% и, наиболее предпочтительно, 6-14% композиции.

5. Композиция по п.1, в которой криопротектор выбран из группы, включающей сахар, полиол, полимер и аминокислоту, предпочтительно, сахар; и сахар является сахарозой; причем криопротектор присутствует в диапазоне от 9 до 91%; предпочтительно, 20-60%, наиболее предпочтительно, 32-41% композиции.

6. Композиция по п.1, в которой наполнитель выбран из группы, включающей сахар, полиол, полимер и аминокислоту, предпочтительно аминокислоту; и аминокислота выбрана из группы, включающей глицин, гистидин, аргинин; предпочтительно, аминокислота представляет собой глицин; при этом наполнитель присутствует в диапазоне от 1 до 78%; более предпочтительно, 20-60% и, наиболее предпочтительно, 38-50% композиции.

7. Композиция по п.1, в которой буфер выбран из группы, включающей фосфатный буфер, натрий-фосфатный буфер (дигидрофосфат натрия - гидрофосфат динатрия), калий фосфатный буфер (дигидрофосфат калия - гидрофосфат калия), ТРИС, цитратный. буфер; предпочтителен фосфатный буфер; при этом буфер находится в диапазоне от 3 до 33%; более предпочтительно, 3-15% и, наиболее предпочтительно, 4-6% композиции.

8. Композиция по п.1, в которой фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество представляет собой соль.

9. Композиция по п.8, в которой соль выбрана из группы, включающей хлорид натрия, хлорид калия, предпочтителен хлорид натрия; причем количество соли в композиции находится в диапазоне 0-40%, предпочтительно, 0-10%, более предпочтительно, 0-0,5% композиции.

10. Композиция по п.1, в которой рН продукта до лиофилизации и после восстановления лиофилизированного продукта составляет 6-8; осмоляльность, предпочтительно, находится в диапазоне 250-600 мОсм/кг, более предпочтительно, 250-500 мОсм/кг и, наиболее предпочтительно, 250-450 мОсм/кг.

11. Способ приготовления композиции по п.1, содержащий:

- a. замораживание
- b. по выбору отжиг;
- c. первичную сушку и
- d. вторичную сушку.

12. Способ получения композиции по п. 11, при котором общее время процесса лиофилизации, предпочтительно, составляет от 2880 мин (48 ч) до 5790 мин (96,5 ч), более предпочтительно, от 3120

мин (52 ч) до 4980. мин (83 ч), наиболее предпочтительно, от 3120 мин (52 ч) до 4200 мин (70 ч); изменение температуры составляет от -60°C до 30°C , более предпочтительно, от -50°C до 30°C , наиболее предпочтительно, от -40°C до 25°C , и изменение давления, предпочтительно, составляет от 0,037 до 760 торр.

13. Способ по п. 11, при котором замораживание проводят при самой низкой температуре этапа замораживания от -10°C до -60°C , более предпочтительно, от -20°C до -50°C , наиболее предпочтительно, от -35°C до -45°C ; общее время, предпочтительно, составляет от 150 до 500 минут, более предпочтительно, от 200 до 400 минут, наиболее предпочтительно, от 240 до 350 минут; самая низкая температура замораживания составляет, предпочтительно, от 20 до 180 минут, более предпочтительно, от 30 до 120 минут, наиболее предпочтительно, от 45 до 90 минут; время выдержки при самой низкой температуре замораживания составляет, предпочтительно, от 120 до 480 мин, более предпочтительно, от 250 до 360 мин, наиболее предпочтительно, от 200 до 300 мин.

14. Способ по п. 11, при котором первичная сушка проводится при от 10°C до -50°C , более предпочтительно, от 0°C до -45°C , наиболее предпочтительно, от -30°C до -40°C ; общее время составляет, предпочтительно, от 35 до 80 часов, более предпочтительно от 40 до 75 часов, наиболее предпочтительно от 50 до 60 часов; время, необходимое для достижения начальной температуры, составляет, предпочтительно, от 100 до 1000 минут, более предпочтительно, от 250 до 500 минут, наиболее предпочтительно, от 300 до 400 минут; давление в начале предпочтительно составляет от 50 до 200 мТорр; максимальная температура в конце этапа первичной сушки составляет, предпочтительно, от 5°C до 25°C , более предпочтительно, от 8°C до 22°C , наиболее предпочтительно, от 10°C до 20°C ; время выдержки при максимальной температуре этапа первичной сушки процесса лиофилизации по настоящему изобретению составляет, предпочтительно, от 5 до 72 часов, более предпочтительно, от 8

до 24 часов, наиболее предпочтительно, от 10 до 14 часов; давление в конце этапа первичной сушки процесса лиофилизации в соответствии с настоящим изобретением составляет, предпочтительно, от 37 до 112 мторр, более предпочтительно от 50 до 90 мторр, наиболее предпочтительно от 60 до 80 мторр.

15. Способ по п.11, при котором вторичная сушка проводится при температуре от 10 до 37°C, более предпочтительно, от 15 до 35°C, наиболее предпочтительно, от 20 до 30°C; общее время составляет, предпочтительно, от 3 до 24 часов, более предпочтительно, от 4 до 16 часов, наиболее предпочтительно, от 4 до 7 часов; время выдержки этапа вторичной сушки лиофилизации составляет, предпочтительно, от 3 до 24 часов, более предпочтительно, от 4 до 16 часов, наиболее предпочтительно, от 4 до 7 часов; и давление составляет, предпочтительно, от 37 мторр до 50 мторр.

16. Лيوфилизированная композиция, полученная способом по п.11.

17. Композиция по п. 1 или 16, в которой объем восстановления на флакон после лиофилизации составляет 1-5,5 мл, и перед лиофилизацией предпочтительно находится в диапазоне 4-25%, более предпочтительно, в диапазоне 6-20%, наиболее предпочтительно, в диапазоне 8-16% от композиции, и конечная концентрация пегаспаргазы находится в диапазоне $750 \pm 20\%$ МЕ/мл.

По доверенности

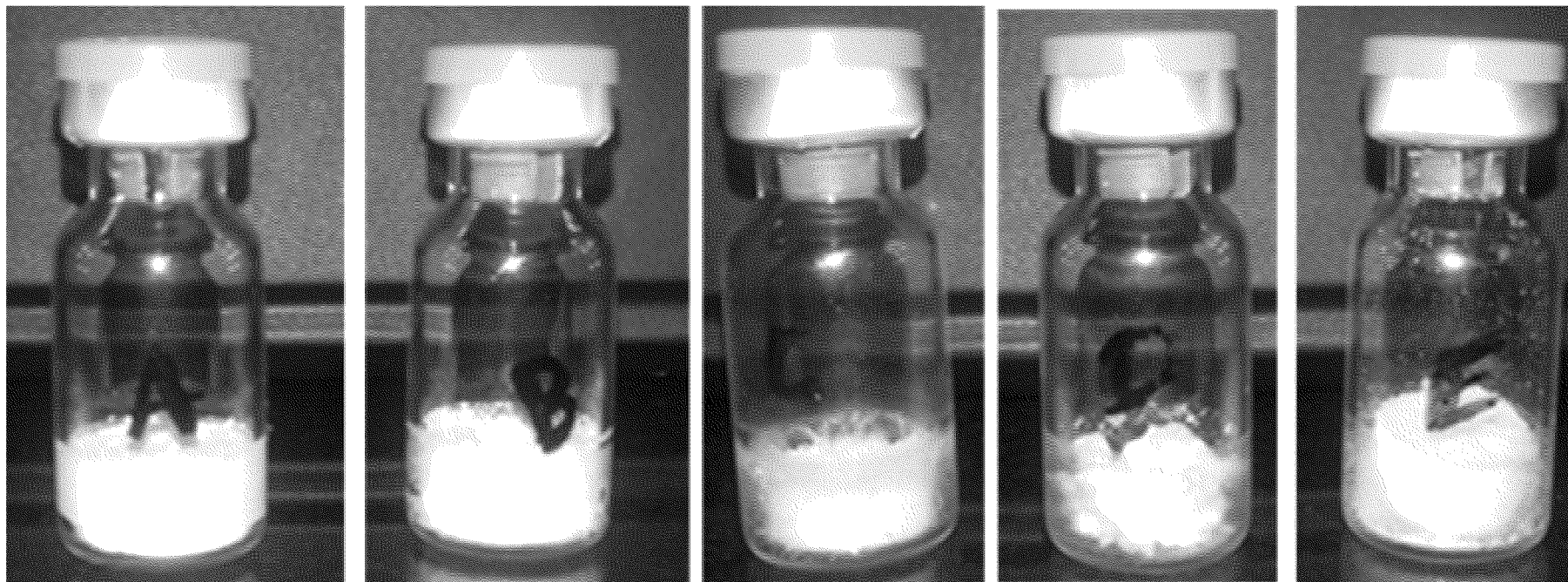
(1)

(2)

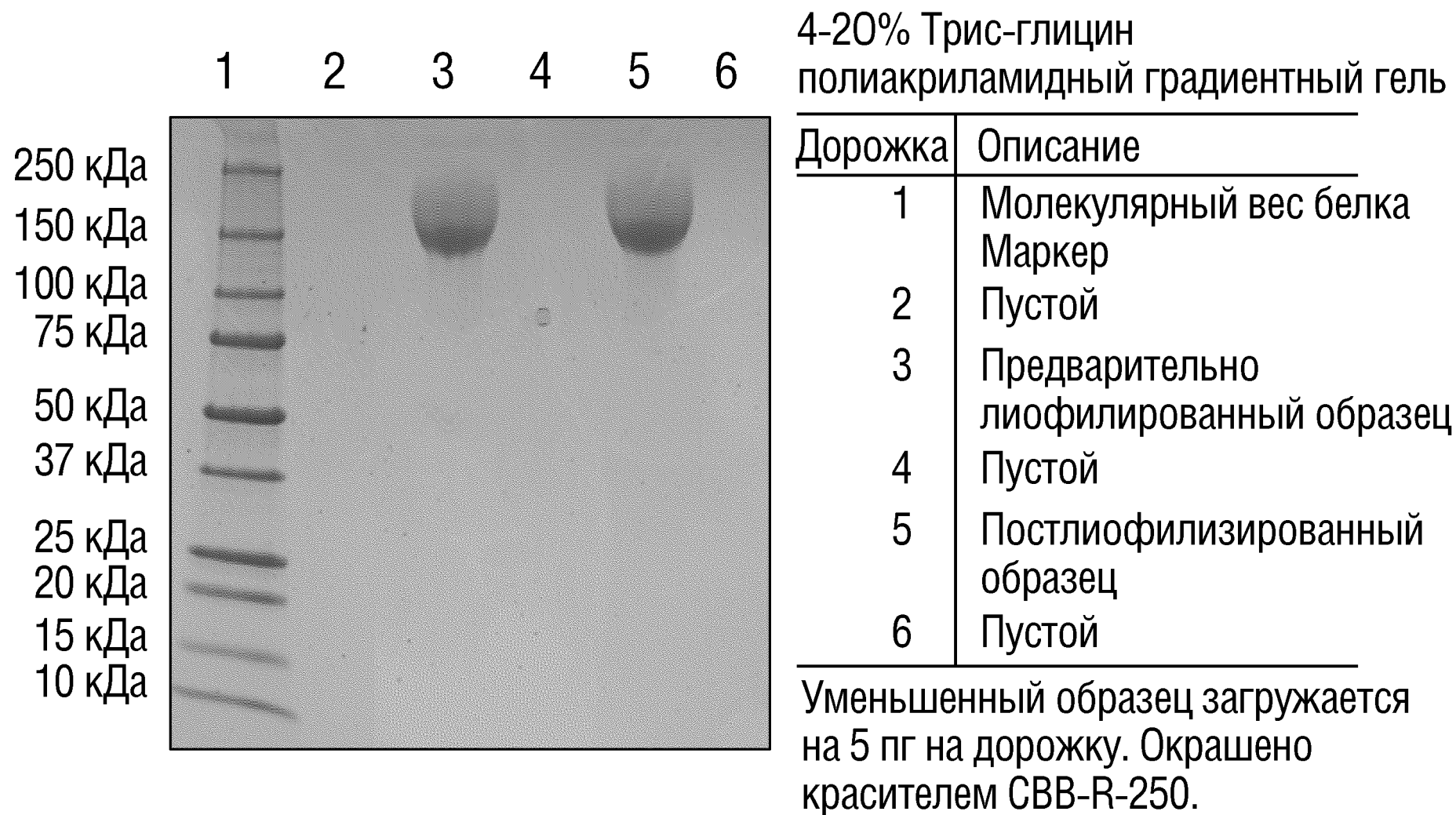
(3)

(4)

(5)

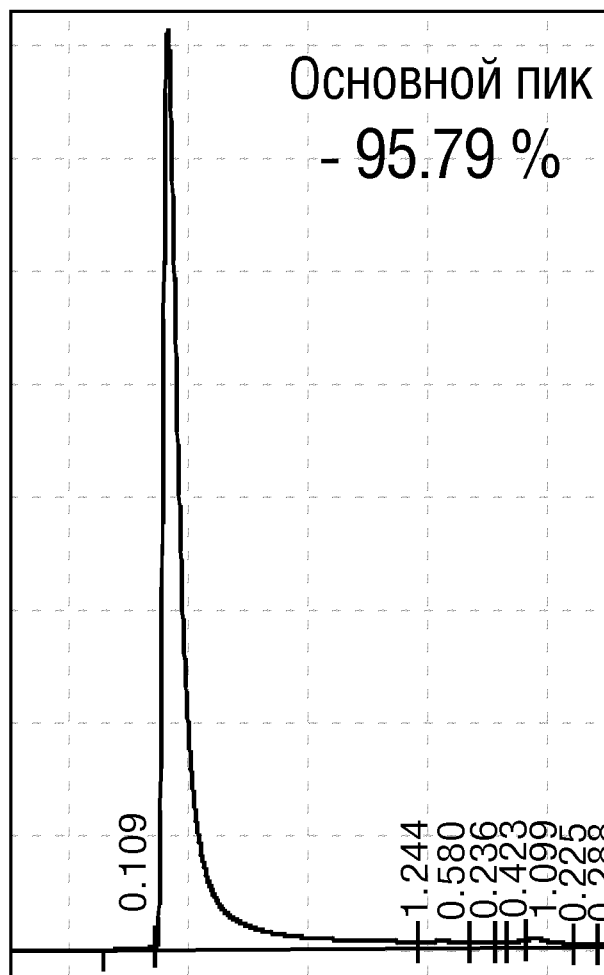


ФИГ. 1



ФИГ. 2А

Предварительно
лиофилированный образец

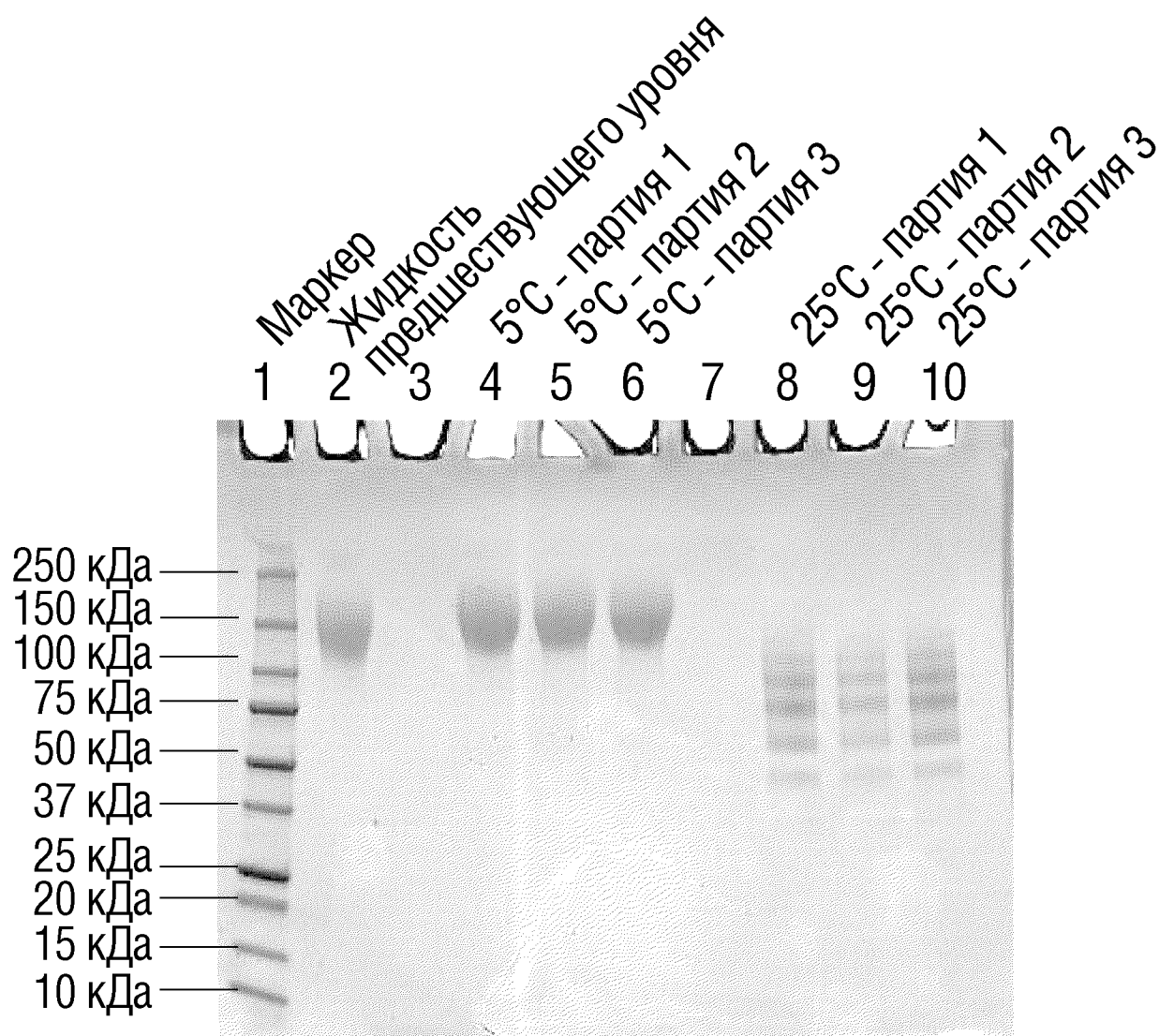


Постлиофилированный
образец



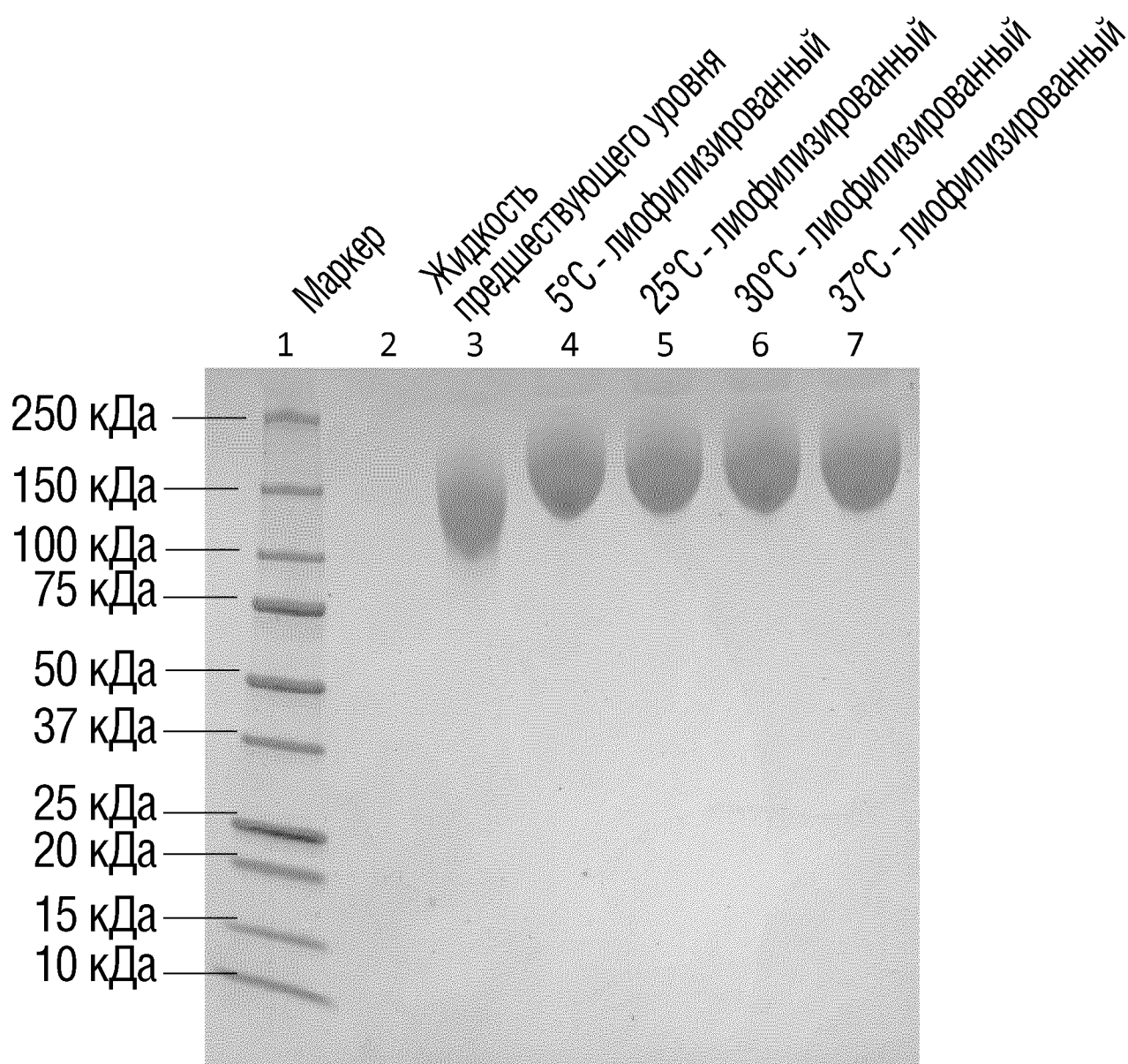
ФИГ. 2В

3-месячное исследование стабильности жидкости – SDS_PAGE

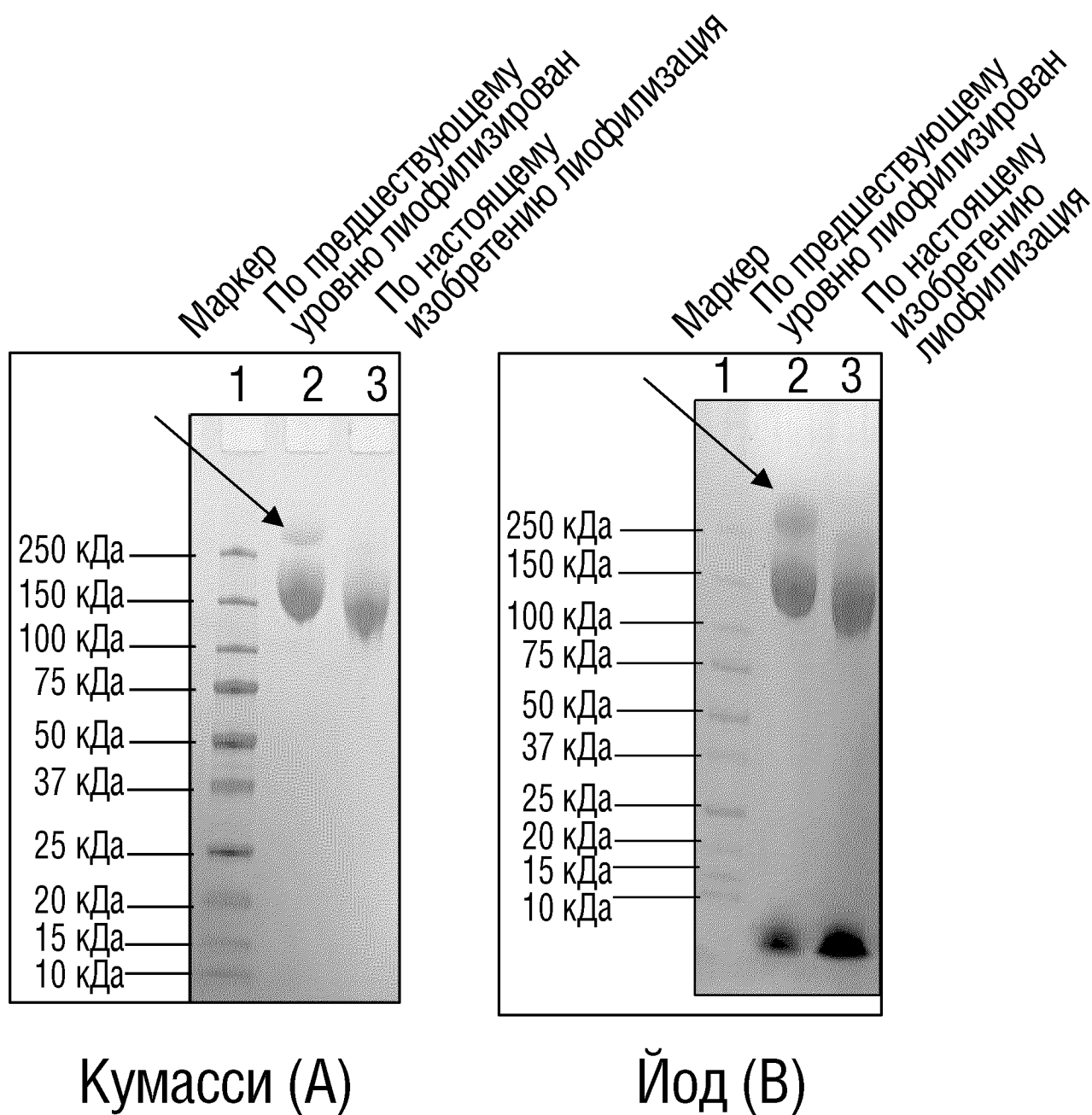


ФИГ. 3А

3-месячное исследование лио-лиофильной стабильности – SDS_PAGE

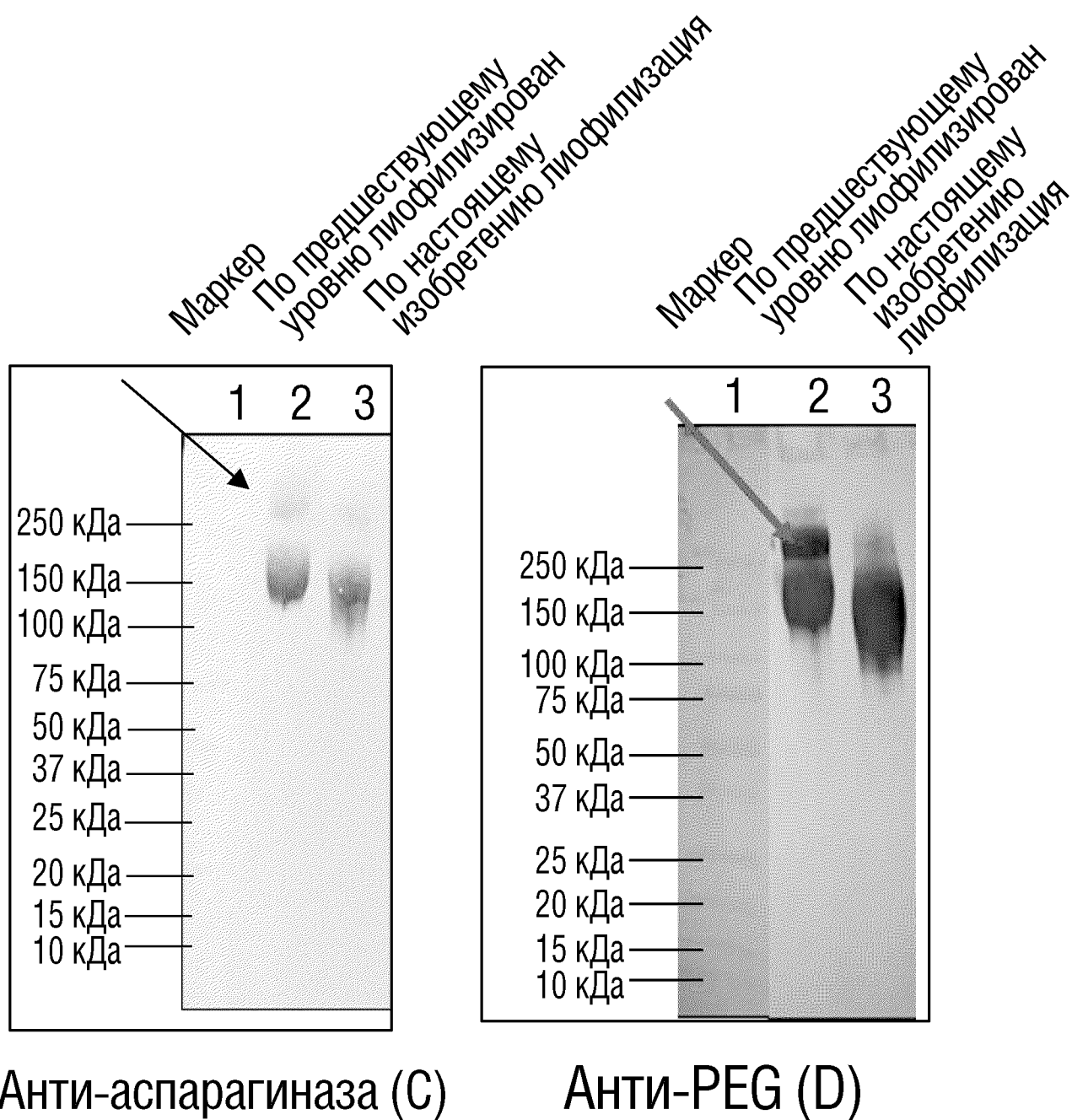


ФИГ. 3В



ФИГ. 4А

ФИГ. 4В



ФИГ. 4С

ФИГ. 4D