

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291951** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.13

(22) Дата подачи заявки
2020.12.10

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

**(54) СТАБИЛЬНАЯ И ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ
НИМОТУЗУМАБА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ**

(31) CU-2019-0104

(32) 2019.12.17

(33) CU

(86) PCT/CU2020/050007

(87) WO 2021/121444 2021.06.24

(71) Заявитель:

**СЕНТРО ДЕ ИНМУНОЛОГИА
МОЛЕКУЛАР (CU)**

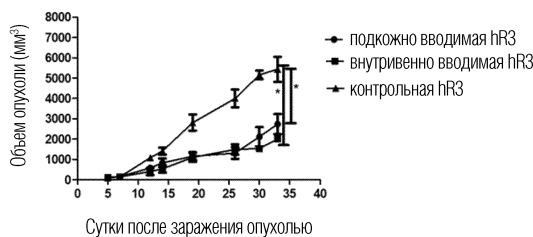
(72) Изобретатель:

**Эрнандес Терреро Яико Саддан,
Фернандес Саес Ольга Лидеа, Санто
Томас Помпа Хулио Фелипе, Седено
Ариас Мерседес, Рашида Де Ла Лус
Эрнандес Катя, Боджано Аё Тамми,
Леон Монсон Калет, Кастильо Витлох
Адолфо (CU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к областям биотехнологии и медицины. В частности, описаны высококонцентрированные и стабильные фармацевтические композиции нимотузумаба на основе гуманизированных моноклональных антител в концентрации в диапазоне от 50 до 200 мг/мл. Низкая вязкость этих растворов позволяет вводить их подкожно или внутримышечно при лечении рака. Эти композиции стабильны как в жидкой, так и в лиофилизированной формах.



A1

202291951

202291951

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574986EA/061

СТАБИЛЬНАЯ И ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННАЯ КОМПОЗИЦИЯ НИМОТУЗУМАБА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к областям биотехнологии и медицины, в частности к получению высококонцентрированной и стабильной композиции нимотузумаба на основе гуманизированных моноклональных антител, предназначенной для подкожного (SC) или внутримышечного (IM) введения для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Нимотузумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело изотипа IgG1 (mAb), которое распознает рецептор Her1 эпидермального фактора роста человека. Его получали путем клонирования ДНК гипервариабельных областей мышино-человеческого моноклонального антитела *10G8* и каркасов вариабельных и константных областей тяжелой и легкой цепей человека (REI и NEWM соответственно) (Mateo, C. et al. (1997), *Immunotechnology* 3: 71-81). Эффективность нимотузумаба была продемонстрирована в клинических испытаниях у пациентов с опухолями головы и шеи (Crombet, T. et al. (2004) *J Clin Oncol.* 22: 1646-1654), глиомой (Ramos, T. et al. (Ramos, T. et al.) (2004). 2006) *Cancer Biol Ther.* 5: 375-379; MacDonald, T. et al. (2011) *Neuro Oncol.* 13: 1049-1058) и опухолью пищевода (Ramos-Suzarte, M. et al. (2012) *Cancer Biology & Therapy* 13: 600-605). В настоящее время, это антитело (Ab) находится в фазе III клинических испытаний у пациентов с раком носоглотки, местнораспространенным раком пищевода и плоскоклеточной карциномой пищевода (Galluzzi, L. et al. (2012) *OncoImmunology.* 1: 28-37).

Введение моноклонального антитела нимотузумаба осуществляется внутривенным (IV) способом в виде инфузии с использованием жидкой композиции, где указанное моноклональное антитело находится в концентрации 5 мг/мл (<https://www.cecmec.com/registro/rcp/cimaher-nimotuzumab>). Это введение осуществляется путем растворения четырех сосудов с нимотузумабом в концентрации 5 мг/мл в пакете с 0,9% раствором NaCl. Композиция коммерческого препарата нимотузумаба также включает натрий-фосфатный буфер в концентрации 15 мМ с pH примерно 7, хлорид натрия в концентрации 150 мМ и полисорбат 80 в концентрации 0,02% (*Revista Cubana de Farmacia.* 2012; 46 (3): 379-380). Нимотузумаб в клинических условиях вводят в дозе 200 мг (400 мг при раке поджелудочной железы) один раз в неделю в течение шести недель в сочетании с лучевой терапией и химиотерапией. Затем вводят поддерживающие дозы, составляющие 200 мг, каждые 15 суток до тех пор, пока это позволяет клиническое состояние пациента. Следовательно, важно иметь способ введения, который облегчает длительное применение нимотузумаба у пациентов вне стационара.

Как известно, внутривенное введение имеет некоторые недостатки, такие как длительный период времени, необходимый для выполнения введения, потребность в

квалифицированном персонале, обученном процедуре введения, риск инфекции и тяжелых побочных реакций (Michael F. Haller (2007) *Pharmaceutical Technology*, 31 (10): 118-132).

В связи с этим, во всем мире наблюдается повышенная тенденция к подкожному введению mAb (Viola M, Sequeira J, et al. (2018) *J Control Release*; 286: 301-314), поскольку этот способ предполагает преимущества такие, как сокращение времени необходимого для выполнения введения и вводимых объемов, снижение риска инфицирования и даже возможность самостоятельного введения препарата пациентом, поскольку легче манипулировать и вводить один сосуд с необходимым количеством препарата (Haller MF (2007) *Pharmaceutical Technology*, 31 (10): 118-132). Внутримышечное введение также имеет преимущества по сравнению с внутривенным введением, такие как более низкие затраты на лечение и меньшая потребность в интенсивной терапии. С другой стороны, риск инфекции ниже, и время введения меньше при внутримышечном способе введения, чем при внутривенном. Кроме того, известно, что при внутримышечном введении лекарственного средства, вероятность возникновения побочных эффектов и передозировки ниже. Следует также отметить, что абсорбция и биодоступность препарата, после внутривенного введения, являются довольно высокими, со значениями, почти такими же высокими, как значения, о которых сообщается при использовании внутривенного способа введения. (Jing-fen Jin et al., *Patient Preference and Adherence*, 2015, 9: 923-942).

В числе mAb, которые в настоящее время используются в клинике в композициях для подкожного введения, существуют трастузумаб (US 9345661) и ритуксимаб (US 10280227), в обеих композициях используется фермент гиалуронидаза для увеличения объема инъекции до больше, чем 1,5 мл, и достижения хорошего биораспределения mAb, гарантируя, таким образом, достижение дозы, необходимой для получения терапевтического эффекта (Shpilberg, O. and C. Jackisch. (2013) *British Journal of Cancer*. 109: 1556-1561).

Другой высококонцентрированной композицией, в которой используется фермент гиалуронидаза, является композиция, описанная в патентной заявке CN107898756A. В этом патенте заявлена композиция mAb нимотузумаба в высоких концентрациях для подкожного или внутримышечного применения. Как сообщается в патенте, присутствие гиалуронидазы в этой композиции необходимо для обеспечения требуемой проницаемости.

Имеются предыдущие сообщения о высококонцентрированных композициях mAb против эпидермального фактора роста, таких как композиция, описанная в патентной заявке WO2011080209, в которой заявлена высококонцентрированная жидкая композиция, полученная путем ультрафильтрации, содержащая mAb против EGFR. Хотя в этом патенте указано, что заявленная композиция может быть использована в отношении mAb нимотузумаба, патент не предоставляет практических доказательств, подтверждающих это утверждение. В этой патентной заявке заявлена концентрация mAb в диапазоне от 1

мг/мл до 200 мг/мл, однако достигается только концентрация mAb hu-ICR62, составляющая до 50 мг/мл. Кроме того, диапазоны вспомогательных веществ и концентраций, заявленные в этой патентной заявке, являются слишком широкими, поскольку они включают почти все наиболее часто используемые вспомогательные вещества и концентрации в уровне техники. В настоящем изобретении было продемонстрировано, что некоторые сочетания вспомогательных веществ и концентраций, включенные в диапазон, заявленный в WO 2011080209, не являются наиболее стабильными или лучшими вариантами композиции для mAb нимотузумаба.

Основным примером mAb, вводимого внутримышечным способом, является mAb паливизумаб. Это mAb представлено в виде лиофилизированной композиции, которая, после восстановления в воде, содержит mAb паливизумаб в концентрации 100 мг/мл в дополнение к вспомогательным веществам, таким как гистидин, глицин и маннит, и используется в дозах 15 мг/кг для лечения респираторно-синцитиального вируса.

Получение композиции mAb, сохраняющей стабильность, низкую мутность и вязкость, является сложной задачей, требующей адекватной методологии скрининга. Задача подбора соответствующего сочетания вспомогательных веществ и условий, необходимых для того, чтобы mAb удовлетворяло вышеуказанным требованиям при высокой концентрации, не является простой, поскольку до сих пор невозможно заранее определить, какое сочетание будет наиболее эффективным для конкретного mAb, поскольку каждое из них отличается и ведет себя по-разному с точки зрения их основных механизмов деградации (Manning MC et al. (2018) *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 112: 1-59; Viola M, Sequeira J, et al. (2018) *J Control Release*; 286 : 301-314).

Авторы настоящего изобретения обнаружили композиции для mAb нимотузумаба, отличные от ранее описанных, которые содержат специфическое сочетание вспомогательных веществ, которое гарантирует стабильность, низкую мутность и низкую вязкость mAb. Эти композиции являются также менее сложными, поскольку они не требуют использования фермента гиалуронидазы, чтобы гарантировать стабильность и проницаемость композиции для подкожного введения. С помощью этих конкретных композиций также достигаются концентрации нимотузумаба от 100 до 180 мг/мл, что позволяет увеличить дозу mAb без увеличения объема введения. Введение этих композиций подкожно или внутримышечным способом облегчает их применение в случае, когда требуется длительное введение в дозах от 200 до 360 мг в случае подкожного введения и от 200 до 720 мг при внутримышечном введении с дополнительным преимуществом в том, что они могут быть введены пациентом самостоятельно.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном из вариантов осуществления, объектом настоящего изобретения являются высококонцентрированные и стабильные фармацевтические композиции моноклональных антител нимотузумаба, которые содержат моноклональные антитела нимотузумаба в

диапазоне концентраций от 100 до 210 мг/мл, буферное вещество в диапазоне от 5 до 30 мМ со значением рН $6,5 \pm 0,5$, поверхностно-активное вещество в диапазоне от 0,02 до 0,06%, аминокислоту или их смесь в диапазоне от 30 до 150 мМ и необязательно углеводов в качестве стабилизатора в диапазоне от 2 до 6%.

В частности, буферное вещество указанных композиций выбрано из гистидинового буфера и фосфата натрия. Поверхностно-активное вещество выбрано из полисорбата 20 и полисорбата 80. Аминокислоты выбраны из L-метионина и глицина. Используемым в композиции углеводов является сахароза.

Более конкретно, вышеуказанные композиции могут быть в жидкой или лиофилизированной форме. Жидкая композиция в концентрации 150 мг/мл имеет вязкость ≤ 5 сП.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение описанных выше фармацевтических композиций для лечения рака. В частности, описан способ лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий подкожное или внутримышечное введение фармацевтических композиций, описанных в настоящем изобретении, в дозе от 200 мг/70 кг до 750 мг/70 кг. Подкожное введение этого mAb осуществляется с использованием инъекции в объеме от 1,3 до 2 мл и концентрации от 150 до 200 мг/мл. Кроме того, mAb можно вводить в одно или несколько мест инъекции в случае, когда необходимы более высокие дозы mAb. В случае внутримышечного введения, при объемах инъекции от 1,3 до 5 мл для концентрации 150 мг/мл, дозы будут достигать 200-750 мг/70 кг. При использовании концентрации 200 мг/мл и внутримышечных объемов 1,3-5 мл, дозы будут достигать 260-1000 мг/70 кг.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Получение стабильных высококонцентрированных композиций mAb нимотузумаба

Настоящее изобретение относится к композициям с высокими концентрациями mAb нимотузумаба, которые также будут обозначаться в настоящем документе как hR3. Концентрация нимотузумаба в описанных в настоящем изобретении композициях находится в диапазоне от 100 до 210 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 100 до 180 мг/мл. Композиции нимотузумаба, описанные в настоящей патентной заявке, содержат буферное вещество, поверхностно-активное вещество, аминокислоты и необязательно углеводов. Буферное вещество может представлять собой гистидин или фосфат натрия в диапазоне от 5 до 30 мМ, что позволяет поддерживать рН композиции в диапазоне рН $6,5 \pm 0,5$. Композиции по настоящему изобретению могут содержать полисорбат 20 или полисорбат 80 в качестве поверхностно-активного вещества в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,06%. Углеводы могут представлять собой сахарозу и трегалозу в диапазоне концентраций от 2 до 6%. Кроме того, аминокислоты выбраны из L-метионина или глицина, или обоих, в диапазоне концентраций от 30 до 150 мМ.

Для получения этих композиций можно использовать систему ультрафильтрации-диафильтрации (УФ/ДФ) Amicon Ultra с целлюлозной мембраной с размером пор от 30 до

50 кДа. Для диафильтрации или концентрирования образца можно использовать скорость центрифугирования от 900 до 1100 g при температуре от 2 до 8°C. Образец подвергается стерилизующей фильтрации, для которой тип используемого фильтра выбирается в зависимости от объема образца. Другой способ получения описанных в настоящем изобретении композиций заключается в использовании лабораторной или экспериментальной системы фильтрации тангенциальным потоком. Для этой цели могут быть использованы мембраны с размером пор 30 и 50 кДа. Диафильтрацию образцов для замены буфера проводят с использованием 10-15 диаобъемов конечного буфера. Для концентрирования образцов, первоначальный объем должен быть уменьшен до объема меньше расчетного объема, который соответствует желаемой концентрации.

Эти композиции могут быть получены посредством пошагового скрининга, состоящего из первой стадии, на которой выбирают лучшие буферы и значения pH. На второй стадии выбирают наиболее подходящие соли, поверхностно-активные вещества и углеводы, а затем на третьей стадии выбирают лучшие аминокислоты для композиции. Другим используемым методом является одновременный скрининг, который заключается в использовании различных видов вспомогательных веществ или их сочетаний по факторному дизайну. При использовании этого метода, существует возможность взаимодействия между более чем 2 или 3 вспомогательными веществами в одной и той же композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лиофилизации и восстановления описанных выше композиций, а также способ получения стабильной изотонической восстановленной композиции. Указанный способ включает восстановление лиофилизированной смеси mAb и стабилизаторов в описанных выше буферах таким образом, чтобы концентрация mAb в восстановленной композиции составляла, по крайней мере, 100 мг/мл и до 210 мг/мл, т.е. в 3-5 раз больше, чем концентрация mAb в смеси перед лиофилизацией.

Определение стабильности высококонцентрированных композиций нимутозумаба

Для подтверждения наиболее стабильных вариантов композиции и влияния каждого вспомогательного вещества на стабильность проводят исследование параметров, определяющих стабильность, посредством динамического рассеяния света (DLS). Этими вышеуказанными параметрами являются параметр диффузионного взаимодействия (kD), дзета-потенциал и температура агрегации (Tagg). Определение kD осуществляют путем измерения коэффициента диффузии нимутозумаба в концентрации от 12 мг/мл до 2 мг/мл. Tagg определяют для исходных образцов при изменении температуры от 25 до 76°C, и дзета-потенциал определяют путем измерения образца при начальной концентрации.

Другим методом, используемым для определения лучших композиций, является стресс-исследование, при котором образцы выдерживаются при температуре 50°C на термостатической бане в течение от 10 до 20 суток, а затем их анализируют через различные промежутки времени с использованием физико-химических и биологических

определений.

Среди этих определений присутствует мутность, которая измеряется по поглощению образцов в УФ-спектре в диапазоне от 340 до 450 нм, что позволяет обнаруживать крупные агрегаты. Другим примером является определение размера частиц посредством DLS, выполняемое путем измерения начальной концентрации интактного неразбавленного образца для обнаружения образования агрегатов или частиц в растворе. Измерение вязкости осуществляется для образцов с высокой концентрацией, используя стандарт размера для DLS в диапазоне 100-500 нм от номинального размера, предпочтительно 200 нм от номинального размера.

Образцы также анализируют посредством ДНС-ПААГ (SDS-PAGE), чтобы определить, происходило ли образование фрагментов в процессе стресс-исследования. Анализ проводили в невосстанавливающих условиях с использованием 7,5% полиакриламидных гелей и красителей кумасси синий или нитрата серебра. Также проводят определение чистоты мономера посредством эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC).

Биологическую активность mAb определяли с помощью относительной активности нимотузумаба по отношению к эталонному веществу, и ее можно измерить посредством проточной цитометрии или по ингибированию клеточной пролиферации в клеточной линии, которая экспрессирует Her1 человека.

Методы лечения

Композиции по настоящему изобретению могут применяться для лечения пациентов с опухолями головы и шеи, глиомой, опухолями пищевода, легких и поджелудочной железы. Для терапевтического применения, указанные композиции необходимо вводить субъекту, страдающему заболеванием, в качестве монотерапии или в сочетании с традиционными методами лечения опухолей, такими как лучевая терапия или химиотерапия, для усиления их терапевтического действия.

Введение этих композиций осуществляется подкожно или внутримышечно. В случае подкожного введения, для дозы 200 мг/70 кг необходимо использовать минимальный объем образца, составляющий 1,33 мл. Для больших доз, объем инъекции может быть увеличен до 2 мл, пока не будет достигнута максимальная доза 300/70 кг. Если требуется введение доз больше, чем 300 мг/70 кг, можно использовать концентрацию mAb больше, чем 150 мг/мл или разделить дозу и вводить ее в два отдельных места инъекции. Места инъекций, которые можно использовать для указанного введения, не ограничиваются следующими: дельтовидные области, области живота и передняя область бедер. Для дозы, используемой в клинике, которая составляет 200 мг в неделю, концентрации нимотузумаба 134 мг/мл было бы достаточно для проведения лечения. Если требуются более высокие дозы, можно использовать более высокую концентрацию нимотузумаба, до 210 мг/мл. Например, для лечения рака поджелудочной железы, для которого требуются дозы 400 мг, следует использовать два отдельных места инъекции.

Согласно опубликованным в литературе данным, максимально допустимый объем внутримышечного введения составляет 5 мл, поэтому, при использовании этого способа введения, объем инъекции может составлять от 1,3 до 5 мл, что обеспечивает дозы от 200 до 750 мг/70 кг для концентрации mAb 150 мг/мл. При использовании концентраций 200 мг/мл доза может достигать 1000 мг/70 кг.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется с помощью следующих примеров и чертежей. Однако эти примеры и чертежи не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Значения kD вариантов композиции mAb hR3, определенные посредством DLS.

Фигура 2: Значения kD различных композиций mAb hR3, содержащих аминокислоты, определенные посредством DLS.

Фигура 3: Размер частиц, измеренный посредством DLS, композиций mAb hR3, содержащих аминокислоты.

Фигура 4: Размер частиц, измеренный посредством DLS, композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранящихся при 4°C в течение 3 месяцев.

Фигура 5: Вязкость, измеренная посредством DLS, композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранящихся при 4°C в течение 3 месяцев.

Фигура 6: Чистота мономера, измеренная посредством SEC-HPLC, композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранящихся при температуре 4°C в течение 3 месяцев.

Фигура 7: Противоопухолевый эффект mAb нимотузаба, введенного внутривенно и подкожно в дозе 50 мг/кг бестимусным мышам Balb/c.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Скрининг композиции вспомогательных веществ для mAb нимотузаба.

Девять вариантов композиции получали в результате факторного дизайна 4 факторов и 1/2 фракции, как показано в таблице 1, вариант hR3sol9 соответствует исходной композиции mAb hR3. После получения, растворы фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм и хранили при температуре 4°C.

Таблица 1. Состав различных вариантов композиций mAb hR3 при скрининге вспомогательных веществ.

Состав различных вариантов композиций mAb hR3									
	hR3sol 1	hR3sol 2	hR3sol 3	hR3sol 4	hR3sol 5	hR3sol 6	hR3sol 7	hR3sol 8	hR3sol 9
15 mM фосфатно-натриевого	+	-	+	-	+	-	+	-	15 mM фосфатно-натриевого

буфера при pH 6									натриевог о буфера при pH 7
15 mM гистидинов ого буфера при pH 6	-	+	-	+	-	+	-	+	-
NaCl при 75 mM	+	+	-	-	-	+	+	-	NaCl при 150 mM
5% сахароза	+	-	-	+	-	-	+	+	-
5% трегалоза	-	-	+	+	-	+	+	-	-
Полисорбат 20 0,05%	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Полисорбат 80 0,05%	-	+	+	-	-	-	+	+	Полисорб ат 80 0,02%
(+): наличие вспомогательного вещества в композиции (-): отсутствие вспомогательного вещества в композиции									

После того, как растворы были получены, замену буфера проводили посредством УФ/ДФ в центрифужном фильтре Amicon Ultra с размером пор 50 кДа, регенерированной целлюлозной мембраной, объемом образца 15 мл. Образцы центрифугировали при 936×g при температуре 4°C. В качестве исходного продукта использовали mAb hR3 в растворе 15 mM натрий-фосфатного буфера, 150 mM хлорида натрия и 0,2 мг/мл твина 80 при pH 7. После получения композиций с концентрацией Ab 10 мг/мл, измерение параметра диффузионного взаимодействия (kD) выполняли посредством DLS.

Как видно на фиг.1, вариантами с более высокими значениями kD и, следовательно, с более стабильными взаимодействиями белок-белок и меньшей склонностью к агрегации были варианты hR3sol8 и hR3sol3, за которыми следовал вариант hR3sol4, что указывает на стабилизирующий эффект углевода в композиции. В процессе этого исследования также наблюдалось, что значение kD варианта hR3sol8 было намного выше, чем у варианта hR3sol3, что позволяет предположить, что сочетания гистидина и сахарозы обладает большей стабильностью, чем сочетание фосфата с трегалозой. Ни в одном из лучших вариантов не было NaCl, что свидетельствует о том, что он оказывает отрицательное влияние на стабильность hR3mAb.

Еще одним из экспериментов, направленных на подтверждение наиболее

стабильных вариантов, был стресс-тест, проводимый при 50°C в течение 14 суток. Для определения чистоты мономера, образцы после воздействия стресса анализировали посредством SEC-HPLC. Из таблицы 2 видно, что вариантами с наибольшей чистотой мономера были hR3sol8 и hR3sol3, что согласуется с результатами измерения значения kD. Вариантами с наименьшей чистотой мономера были hR3sol9 и hR3sol2, то есть имеющие в своем составе хлорид натрия, что еще раз подтверждает предыдущие результаты, демонстрирующие отрицательное влияние этого вспомогательного вещества на стабильность независимо от типа используемого буфера.

Таблица 2. Значения чистоты мономера, измеренные посредством SEC-HPLC, композиций hR3mAb после воздействия стресса при 50°C в течение 14 дней.

Чистота мономера, измеренная посредством SEC-HPLC (нормализованная высота пика)									
Время (сутки)	hR3sol1	hR3sol2	hR3sol3	hR3sol4	hR3sol5	hR3sol6	hR3sol7	hR3sol8	hR3sol9
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	78,19	71,85	85,99	87,66	83,55	74,94	83,16	91,71	72,12
8	66,40	55,63	79,65	80,62	74,71	63,82	75,53	81,02	55,40
11	61,54	47,59	73,38	75,04	67,46	53,14	66,74	75,19	45,46
14	54,38	38,50	68,89	64,01	61,99	49,19	61,60	71,73	39,31

На основании ранее полученных результатов был сделан вывод, что наиболее стабильными вариантами композиции mAb hR3 являются те, которые содержат некоторые углеводы, такие как сахароза и трегалоза при отсутствии хлорида натрия. Кроме того, сочетание сахарозы с гистидином значительно более стабильно, чем сочетание фосфата с трегалозой.

Пример 2. Скрининг аминокислот для композиции mAb hR3.

Из двух лучших вариантов, полученных после отбора вспомогательных веществ, получали разные растворы и к каждому добавляли аминокислоту (L-аргинин, L-метионин, глицин). Способ получения был аналогичен описанному в примере 1 для скрининга вспомогательных веществ. В таблице 3 показаны варианты композиции mAb hR3, которые содержат разные аминокислоты.

Таблица 3. Состав различных композиций mAb hR3 в присутствии аминокислот.

Состав различных композиций mAb hR3									
	hR3sol30	hR3sol31	hR3sol32	hR3sol33	hR3sol80	hR3sol81	hR3sol82	hR3sol83	hR3sol90
15 мМ фосфатно-натриевого	+	+	+	+	-	-	-	-	15 мМ фосфатно-натриевого

буфера при pH 6									буфера при pH 7
15 мМ гистидинового буфера при pH 6	-	-	-	-	+	+	+	+	-
NaCl при 75 мМ	-	-	-	-	-	-	-	-	NaCl при 150 мМ
5% сахароза	-	-	-	-	+	+	+	+	-
5% трегалоза	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Полисорбат 80 0,05%	+	+	+	+	+	+	+	+	Полисорбат 80 0,02%
50 мМ L-аргинин	-	+	-	-	-	+	-	-	-
50 мМ L-метионин	-	-	+	-	-	-	+	-	-
50 мМ глицина	-	-	-	+	-	-		+	-
(+) : наличие вспомогательного вещества в композиции (-) : отсутствие вспомогательного вещества в композиции									

Результаты измерения kD , выполненного посредством DLS, показаны на фигуре 2. Как видно, вариантами с самым высоким значением kD были hR3sol80, hR3sol81, hR3sol82 и hR3sol32; из них наиболее стабильными были варианты с гистидиновым буфером. Следует также отметить, что в обоих буферах присутствие метионина приводит к высоким значениям kD , чего не происходит с другими аминокислотами.

Различные композиции подвергались стрессу при 50°C в течение 15 суток в термостатической бане, и диаметр частиц измеряли посредством DLS через 0, 5, 12 и 15 суток. На фиг. 3 показаны результаты этих измерений. Как видно, вариантами с меньшим диаметром частиц и, следовательно, с меньшей агрегацией были варианты hR3sol80, hR3sol82 и hR3sol83. Это подтверждает, как обнаружено, что композиции с гистидиновым буфером более стабильны, чем композиции с фосфатным буфером, а также что варианты, содержащие L-метионин или глицин, более стабильны, чем композиции с L-аргинином.

Кроме того, в таблице 4 показаны значения чистоты мономера композиций, подвергнутых стрессу при 50°C.

Таблица 4. Нормализованные значения чистоты мономера, измеренные посредством SEC-HPLC, композиций mAb hR3 при 5 мг/мл в присутствии аминокислот после воздействия стресса при 50°C.

Нормализованные значения чистоты мономера, измеренные посредством SEC-

HPLC (нормализованная высота пика)									
Время (сутки)	hR3sol3 0	hR3sol3 1	hR3sol 32	hR3sol3 3	hR3sol 80	hR3sol 81	hR3sol 82	hR3sol 83	hR3sol 90
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	78,72	74,91	78,61	79,89	87,19	71,19	86,19	82,17	64,65
12	65,04	57,99	63,05	63,44	73,92	52,75	76,19	60,53	51,20
15	58,89	52,11	58,60	61,16	65,05	44,68	72,28	49,17	39,72

Из таблицы 4 видно, что вариантами с наибольшей чистотой мономера, после воздействия стресса, являются hR3sol82 и hR3sol80. Этот результат указывает на то, что варианты с гистидиновым буфером более стабильны, чем варианты с фосфатным буфером. Это также предполагает, что композиция с метионином более стабильна, чем композиция без аминокислот. Композициями с самой низкой чистотой были hR3sol81 и hR3sol90. Это предполагает, что и L-аргинин, и хлорид натрия оказывают дестабилизирующее действие на композиции mAb hR3. Согласно ранее полученным результатам, композиция mAb hR3, которая содержит гистидиновый буфер с pH 6, сахарозу, полисорбат 80 и L-метионин, является наиболее стабильной.

Эти результаты показывают, что варианты hR3sol2, hR3sol6, hR3sol31, hR3sol81 и hR3sol90, которые находятся в пределах заявляемого диапазона сочетаний, описанных в патенте WO 2011080209, не рекомендуются для нимотузумабного mAb, поскольку их низкая стабильность оказывает отрицательное влияние на их эффективность и безопасность их введения пациентам. Вышеописанное поддерживает концепцию, изложенную в литературе, о том, что композиции, которые являются стабильными для одного белка, не обязательно являются стабильными для другого белка по причине структурных различий между белками.

Пример 3. Исследование стабильности при хранении mAb hR3 в высокой концентрации при хранении при 4°C

Определяли параметры стабильности вариантов hR3sol80, hR3sol82 и hR3sol90 при концентрации 150 мг/мл МАТ, хранящихся при 4°C. Образцы подвергались физико-химическому анализу диаметра частиц и вязкости посредством DLS и анализу чистоты мономера посредством ВЭЖХ через 0 и 3 месяца.

На фиг.4 показаны результаты измерения диаметра частиц, измеренные посредством DLS, для различных вариантов. Как видно на фигуре, в каждой из композиций диаметр оставался постоянным в течение 3 месяцев, что указывает на отсутствие агрегации в образцах при высоких концентрациях. Однако следует отметить, что диаметр частиц варианта hR3sol90 в начальный момент времени составлял около 25 нм, что больше, чем у других композиций. Это предполагает, что этот вариант имеет большую тенденцию к самоассоциации между молекулами по сравнению с вариантами hR3sol80 и hR3sol82.

На фиг.5 показаны значения вязкости, измеренные методом DLS, со стандартным

размером частиц 200 нм. Во всех случаях, вязкость имела очень незначительные вариации, что указывает на отсутствие эффекта агрегации или самоассоциации между молекулами. Кроме того, важно отметить, что все значения были ниже 5 сП, что значительно ниже пределов, установленных для достижения адекватной инъекционной способности и технологичности (Li Li, Sandeep Kumar et al. Pharm Res (2014) 31: 3161-3178). Кроме того, значения вязкости ниже, чем у других Abs при концентрации 150 мг/мл.

На фиг.6 показан график чистоты мономера, измеренной посредством SEC-HPLC. Как видно, чистота мономеров не демонстрирует значительных изменений, что позволяет предположить, что композиции mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранящиеся при 4°C, стабильны.

Кроме того, определяли биологическую активность композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл без воздействия стресса в моменты времени 0 и 3 месяца. Биологическую активность определяли по распознаванию рецептора эпидермального фактора роста человека (Her1) mAb hR3 посредством анализа проточной цитометрии и анализа ингибирования клеточной пролиферации. Для проведения анализа методом проточной цитометрии использовали 2×10^5 клеток H292 на лунку и строили кривую концентрации для 81 мкг/мл с разбавлением 1/3, чтобы затем определить среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Полумаксимальную эффективную концентрацию (EC_{50}) определяли по значению MFI и сравнивали с коммерческим эталонным материалом hR3 для получения относительной активности. Анализ клеточной пролиферации проводили с клетками H292 и с использованием раствора реагента клеточной пролиферации WST-1 в качестве красителя. Полученную абсорбцию сравнивали с коммерческим эталонным материалом hR3 для определения относительной активности. Результаты обоих измерений в момент времени 0 показаны в таблице 5, а результаты измерений, проведенных через 3 месяца после начала исследования, показаны в таблице 6.

Таблица 5. Биологическая активность композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл без воздействия стресса в начальный момент времени.

Биологическая активность mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл в момент t0					
Образец	Распознавание клеток с помощью цитометрии (%)	Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) по данным цитометрии		Анализ пролиферации клеток	
	3 мкг/мл	RP Цитометрия	CI	RP Клеточная пролиферация	CI
hR3sol80 t0	99,11	81	73-89	101	91-113
hR3sol82 t0	99,04	83	78-89	104	78-139

hR3sol90 t0	99,11	79	74-84	93	59-147
RP: относительная эффективность в % относительно эталонного коммерческого mAb hR3.					
CI: доверительный интервал					

В таблице 5 показано, что относительная активность вариантов hR3sol80, hR3sol82 и hR3sol90 составляла от 79 до 83%, что было определено методом проточной цитометрии, что указывает на то, что они сохраняют свою биологическую активность даже при высоких концентрациях. С другой стороны, значения относительной активности, полученные в анализе ингибирования клеточной пролиферации, составляли от 93 до 104%, что подтверждает результат цитометрии и демонстрирует, что образцы при высокой концентрации сохраняют свою биологическую активность. Следует принять во внимание, что каждое значение находится внутри другого доверительного интервала в результате внутренней вариабельности в каждом анализе. Несмотря на это, значения находятся в пределах диапазона, приемлемого для каждого анализа.

Таблица 6. Результаты биологической активности композиций hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранящихся при 4°C в течение 3 месяцев.

Образец	Распознавание клеток посредством цитометрии (%)	Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) по данным цитометрии		Анализ пролиферации клеток	
		RP Цитометрия	CI	RP Ингибирование	CI
hR3sol80 3M	93,93	81	56-117	77	66-89
hR3sol82 3M	87,85	46	42-49	45	35-57
hR3sol90 3M	93,76	78	72-84	86	69-107
RP: относительная эффективность в % относительно эталонного коммерческого mAb hR3.					
CI: доверительный интервал					

В таблице 6 показаны результаты биологической активности композиций hR3 в концентрации 150 мг/мл, хранившихся при 4°C в течение 3 месяцев. Как можно отметить, образцами с самым высоким значением относительной активности были hR3sol80 и hR3sol90, значения которых составляли от 78 до 81% в распознавании методом цитометрии и от 77 до 86% в ингибировании анализа пролиферации.

Пример 4. Стресс-исследование при 50°C лучших вариантов композиции mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл.

В вариантах композиций hR3sol80, hR3sol82 и hR3sol90, hR3 концентрировали до

150 мг/мл посредством УФ/ДФ в центрифужном фильтре Amicon Ultra с регенерированной целлюлозной мембраной размером пор 50 кДа с объемом образца 15 мл. Образцы центрифугировали при 936 g при температуре 4°C. После достижения концентрации 150 мг/мл, образцы фильтровали через фильтры с размером пор 0,2 мкм и помещали на термостатическую баню при 50°C. Отбор проб различных композиций проводили в сутки 0, 4, 10 и 15 для измерения физико-химических параметров. В таблице 7 показаны результаты измерения чистоты мономера, проведенного в разные сутки отбора проб.

Таблица 7. Нормализованные значения мономерной чистоты композиций mAb hR3 в концентрации 150 мг/мл после воздействия стресса при 50°C в течение 15 суток.

Результаты чистоты мономера hR3, измеренные посредством SEC-HPLC, при концентрации 150 мг/мл после стресса при 50°C (нормализованная высота пика)			
Время (сутки)	hR3sol80conc	hR3sol82conc	hR3sol90conc
0	100,00	100,00	100,00
4	45,34	58,99	Осадок белого цвета
10	Гель желтого цвета	43,94	Осадок белого цвета
15	Гель желтого цвета	Гель желтого цвета	Осадок белого цвета

Как видно из таблицы 7, после 4 суток стресса, вариант hR3sol90 полностью осаждался с образованием белого твердого вещества, в то время как вариант hR3sol80 имел чистоту мономера 45,3%, а вариант hR3sol82 имел чистоту мономера 58,9%. Из этого результата можно сделать вывод, что наиболее стабильной композицией при высоких концентрациях является hR3sol82, тогда как наименее стабильной является композиция hR3sol90. Этот результат совпадает с результатами, полученными при низкой концентрации. Через 10 дней стресса, вариант hR3sol80 образует гель желтого цвета, в то время как вариант hR3sol82 остается в растворе с чистотой мономера 43,9%. При отборе проб в сутки 15, вариант hR3sol82 также образует гель желтого цвета. Предыдущие результаты демонстрируют, что композиция hR3sol82, содержащая L-метионин, более стабильна при высоких концентрациях, чем варианты, в которых отсутствует эта аминокислота. Эти результаты предполагают, что в долгосрочной перспективе наиболее стабильными композициями будут hR3sol80 и hR3sol82, тогда как композиция hR3sol90 будет наименее стабильной.

В таблице 8 показано процентное содержание мономера и димеров в образцах при концентрации 150 мг/мл без стрессового воздействия.

Таблица 8. Чистота мономера композиций mAb hR3 при концентрации 150 мг/мл без стрессового воздействия.

Чистота hR3 при концентрации 150 мг/мл в момент t0, определенная посредством SEC-HPLC (%)			
Молекулярны	hR3sol80conc	hR3sol82conc	hR3sol90conc

е частицы			
Мономер	93,03	94,11	92,02
Димер	6,30	5,29	7,17
Агрегат	0,56	0,45	0,79
Фрагмент	0,099	0,015	0,010

Как видно из таблицы, композиция hR3sol82 представляет собой композицию с самым высоким процентным содержанием мономеров (94,1%) и композицию с самым низким процентным содержанием димеров (5,2%), что демонстрирует тенденцию этой композиции к снижению количества ассоциаций между содержащимися в ней молекулами, что способствует стабильности. Варианты hR3sol80 и hR3sol90 имеют процентное содержание мономера 93,0% и 92,0% соответственно.

Биологическую активность композиций mAb hR3 при концентрации 150 мг/мл также определяли посредством проточной цитометрии перед тем, как подвергнуть их воздействию стресса при 50°C, и посредством анализа ингибирования клеточной пролиферации. Для осуществления обоих определений использовали один и тот же метод, описанный в примере 3.

Пример 5. Биодоступность mAb нимотузума, вводимого подкожно в различных дозах мышам Balb/c.

Принимая во внимание, что используются одни и те же Ab и способ введения, и что изменения в компонентах композиции не оказывают существенного влияния на фармакокинетическое поведение Ab, исследование биодоступности проводили с вариантом hR3sol90. Для проведения этого анализа использовали самок мышей Balb/c массой приблизительно 20 г. Животных разделяли на 4 группы, которым вводили подкожно дозы композиции hR3sol90 с 4 различными уровнями (25, 50, 100 и 200 мг/кг массы). Перед введением, mAb метили изотопом йода 125 (¹²⁵I). Затем отбирали кровь каждой отдельной мыши и измеряли радиоактивность, которая пропорциональна концентрации Ab в крови. В таблице 9 показаны значения биодоступности, полученные при различных уровнях доз, по сравнению с внутривенной дозой 25 мг/кг. Для определения биодоступности (F) используется следующая формула:

$$F = (SC-AUC/IV-AUC) * (IVd/SCd) \text{ где:}$$

SC-AUC: площадь под кривой при подкожном способе введения

IV-AUC: площадь под кривой при внутривенном способе введения

IVd: внутривенная доза

SCd: подкожная доза

Для внутривенного способа введения биодоступность соответствует 1, так как 100% исходного препарата поступает в общий кровоток.

Таблица 9. Биодоступность mAb нимотузумаба, вводимого подкожно при различных уровнях доз.

Вычисление абсолютной биодоступности на основе площади под кривой с момента
--

0 до бесконечности для mAb нимотузумаба, вводимого подкожно				
Введенный объем (мл)	Общая введенная масса (мг)	Подкожная доза в мг/кг	Площадь под кривой с момента 0 до бесконечности (мкг/мл*h)	Биодоступность (%)
0,2	0,5	25	15153	83,7
0,2	1,0	50	30813	87,2
0,2	2,0	100	54264	78,7
0,2	4,0	200	124280	88,0
Внутривенная доза=25 мг/кг				

Результаты в таблице 9 показывают, что во всех случаях биодоступность превышала 75%, что является приемлемым для этого типа введения. Следует отметить, что хотя биодоступность практически не увеличивается с увеличением дозы, общая масса mAb и площадь под кривой увеличиваются. Если эти результаты экстраполировать на человека, например, в случае подкожной дозы 100 мг/кг, это означает, что даже если биодоступность составляет 78,7%, общая масса mAb, которые попадут в кровоток, составит 630 мг, что более чем в три раза превышает дозу, используемую в клинике (200 мг).

Пример 6. Противоопухолевый эффект mAb нимотузумаба, вводимого внутривенно и подкожно в дозе 50 мг/кг бестимусным мышам Balb/c.

Самок бестимусных мышей Balb/c массой около 20 г разделили на три группы по пять животных в каждой. Все группы получали 2×10^6 клеток A431 в сутки 0 и в сутки 10, 12, 14 и 16, группе 1 вводили 1 мг общей массы композиции hR3sol90 подкожно, группе 2 вводили 1 мг общей массы mAb нимотузумаба внутривенным способом и контрольная группа, группа 3, получала фосфатно-солевой буфер.

На фигуре 7 показан объем опухоли у мышей, которым вводили нимотузумаб подкожно, причем внутривенный способ введения был аналогичным. Это демонстрирует отсутствие различий в эффективности лечения при использовании этих двух способов, несмотря на то, что скорость абсорбции и фармакокинетические характеристики каждого способа являются различными. С другой стороны, в контрольной группе наблюдалась гораздо более высокая скорость роста опухоли, которая даже значительно отличалась от скорости роста в двух других группах. Это демонстрирует эффективность подкожного введения mAb нимотузумаба.

Пример 7. Чистота лиофилизированного mAb нимотузумаба при концентрации 150 мг/мл.

Композиции hR3sol80, hR3sol82 и hR3sol90 лиофилизировали при концентрации 150 мг/мл и объеме 500 мкл. Для этого использовали лабораторный лиофилизатор при температуре -30°C , вакуумировали в течение 30 часов до получения сухого порошка.

Затем композиции восстанавливали в 500 мкл сверхчистой воды до достижения исходной концентрации и получения прозрачного раствора без частиц.

В таблице 10 показаны результаты данных чистоты для различных композиций mAb нимотузумаба после лиофилизации и последующего восстановления.

Таблица 10. Чистота mAb нимотузумаба после лиофилизации и восстановления.

Чистота mAb нимотузумаба после лиофилизации и восстановления при концентрации 150 мг/мл			
Образцы	Мономер (%)	Димер (%)	Мономер+Димер (%)
hR3sol80	94,18	5,73	99,91
hR3sol82	98,8	1,17	99,97
hR3sol90	93,65	5,89	99,54

Как можно видеть, композиция hR3sol82 после лиофилизации и восстановления достигла мономерной чистоты более 98%, тогда как вариант hR3sol80 достиг мономерной чистоты около 94%, а вариант hR3sol90 достиг более 93%. Также следует отметить, что процентное содержание димеров меняется в зависимости от типа композиции. Кроме того, в таблице показано, что чистота мономера и димера этих лиофилизированных и восстановленных композиций во всех случаях превышала 99%, что указывает на то, что mAb нимотузумаб не теряет своей стабильности, несмотря на стресс в процессе лиофилизации. Можно отметить, что нимотузумаб mAb имеет баланс между мономерами и димерами благодаря характеристикам этого mAb, этот баланс может варьироваться в зависимости от типа взаимодействий, происходящих в растворе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Высококонцентрированная и стабильная фармацевтическая композиция моноклонального антитела (mAb) нимотузумаба, характеризуемая тем, что она содержит:

- а) mAb нимотузумаб в концентрации от 100 до 210 мг/мл,
- б) буферное вещество в концентрации от 5 до 30 мМ с рН $6,5 \pm 0,5$,
- с) поверхностно-активное вещество в диапазоне от 0,02 до 0,06%,
- д) аминокислоту или их смесь в диапазоне от 30 до 150 мМ и
- е) необязательно углевод в качестве стабилизатора в диапазоне от 2 до 6%.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что буферное вещество выбрано из группы, включающей:

- гистидиновый буфер и
- фосфат натрия.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество выбрано из группы, включающей:

- полисорбат 20 и
- полисорбат 80.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что аминокислота выбрана из группы, включающей:

- L-метионин и
- глицин.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что углевод представляет собой сахарозу.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5 в своей жидкой форме.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5 в своей лиофилизированной форме.

8. Фармацевтическая композиция по п.6, отличающаяся тем, что она имеет вязкость ≤ 5 сП при концентрации 150 мг/мл.

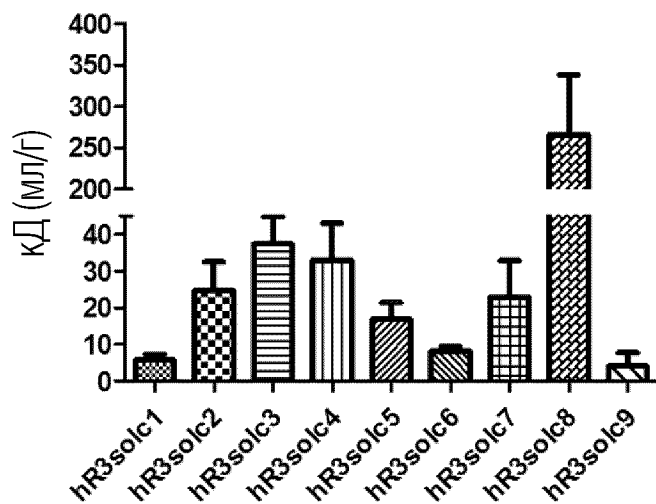
9. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-8 для лечения рака.

10. Способ лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий подкожное введение фармацевтических композиций по любому из пп.1-8 при уровне дозы от 200 мг/70 кг до 400 мг/70 кг с использованием объема инъекции от 1,3 до 2 мл, причем доза фармацевтической композиции может быть разделена и введена в два или более отдельных мест инъекции.

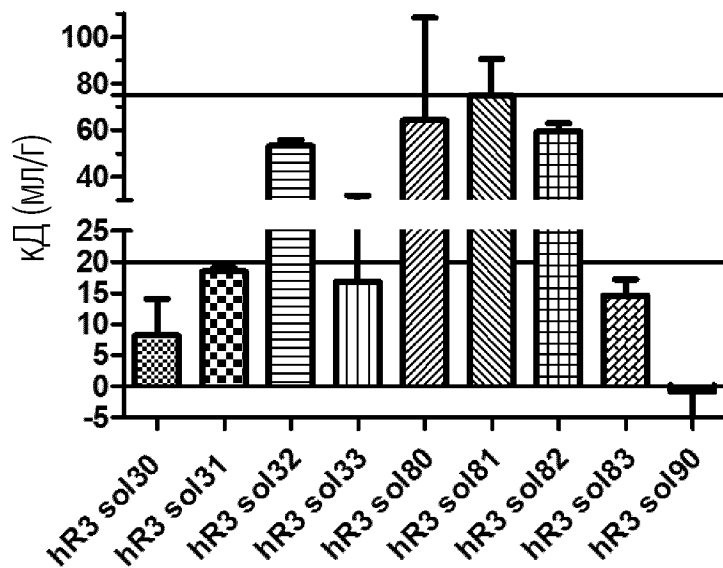
11. Способ лечения пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий внутримышечное введение фармацевтических композиций по любому из пп.1-8 при уровне дозы от 150 мг/70 кг до 1000 мг/70 кг с использованием объема инъекции от 1,3 до 5 мл.

По доверенности

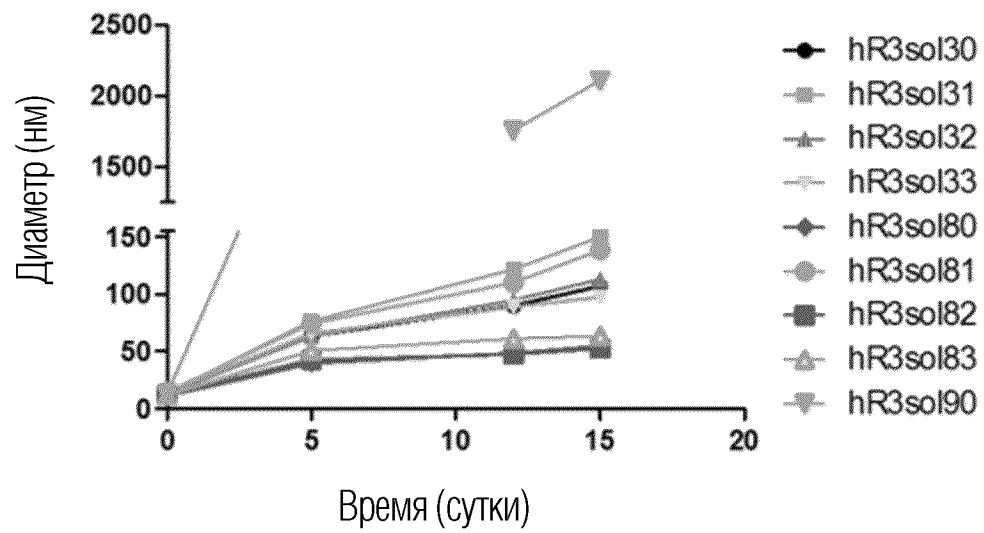
ФИГ. 1



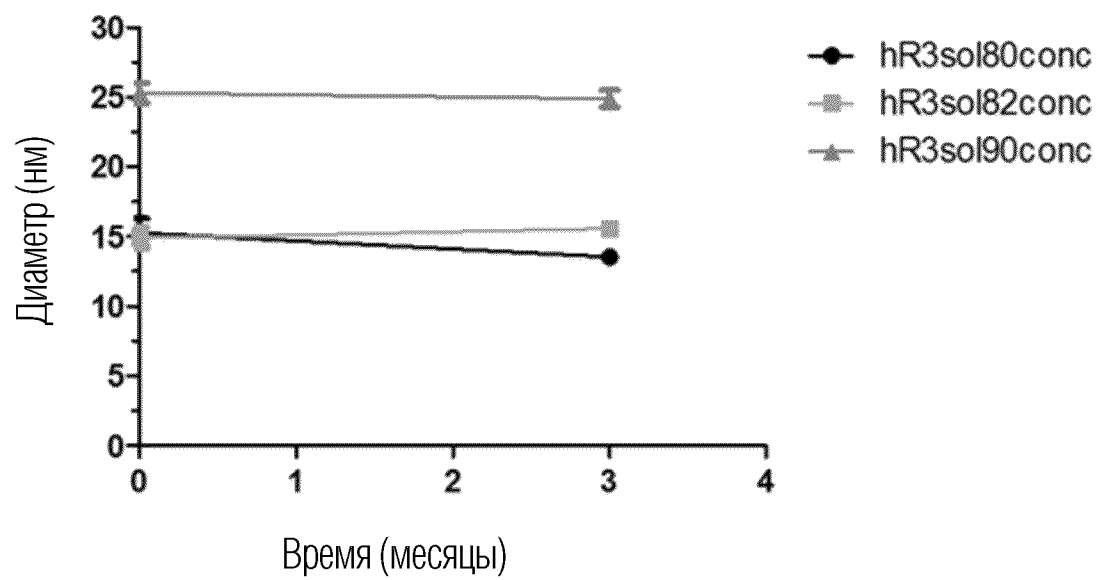
ФИГ. 2



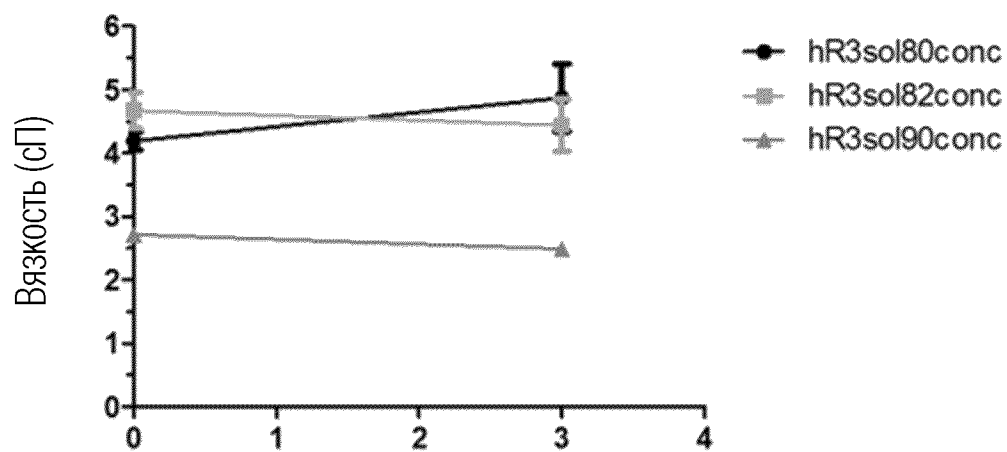
ФИГ. 3



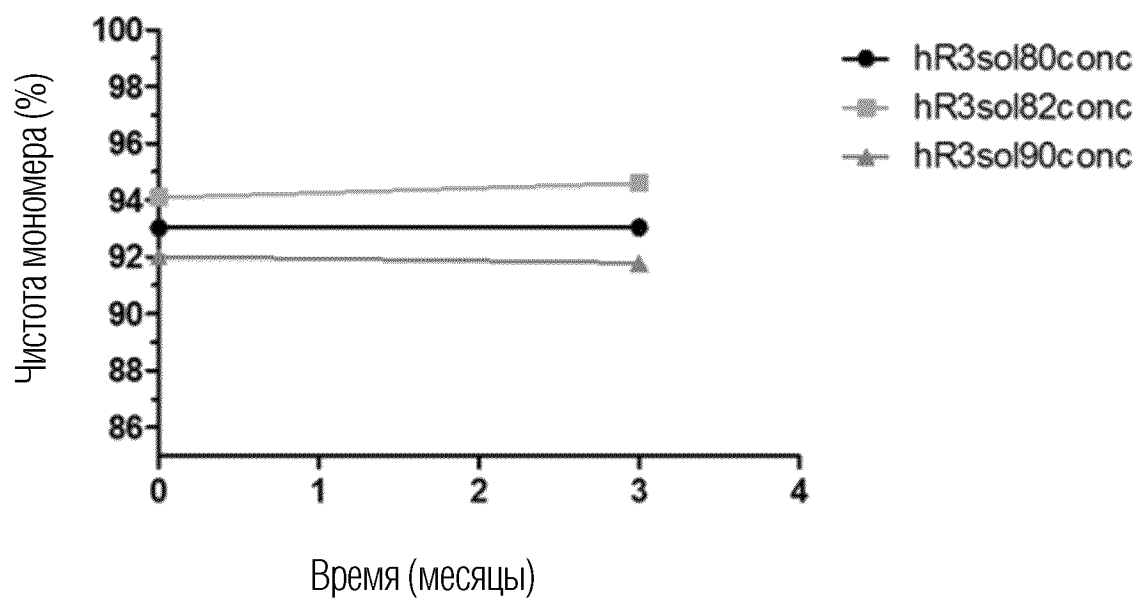
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

