

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042700**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201900360

(22) Дата подачи заявки
2017.12.29

(54) **ВОДНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ АДАЛИМУМАБА ДЛЯ
ВНУТРИВЕННОГО ИЛИ ПОДКОЖНОГО ВВЕДЕНИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **2016152691; 2017146821**

(56) **WO-A1-2010121140**

(32) **2016.12.30; 2017.12.29**

WO-A2-2012065072

(33) **RU**

**DOSON P. et al., Spravochnik biokhimika,
Moscow, "Mir", 1991, p. 357**

(43) **2019.12.30**

(86) **PCT/RU2017/050133**

(87) **WO 2018/124948 2018.07.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "БИОКАД" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ломкова Екатерина Александровна,
Яковлев Александр Олегович,
Шитикова Виктория Олеговна,
Ряховская Анастасия Михайловна,
Морозов Дмитрий Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
Мельчаева О.А. (RU)

(57) Изобретение относится к медицинской фармакологии и касается, в частности, водной фармацевтической композиции адалимумаба для внутривенного или подкожного введения, способа получения данной композиции и ее применения. Состав водной фармацевтической композиции адалимумаба по изобретению позволяет предотвратить образование агрегатов адалимумаба, получить устойчивость к заморозке-разморозке, устойчивость к термическому стрессу при 50°C при длительном исследовании, устойчивость к шейк-тесту при длительном исследовании, а также сохранить эффективность и стабильность адалимумаба в течение длительного периода времени.

B1

042700

042700

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к медицинской фармакологии и касается, в частности, водной фармацевтической композиции адалимумаба для внутривенного или подкожного введения, способа получения данной композиции и ее применения.

Уровень техники

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО α) представляет собой природный цитокин млекопитающих, продуцируемый различными типами клеток, включая моноциты и макрофаги, в ответ на эндотоксин или другие стимулы. ФНО α представляет собой основной медиатор воспалительных, иммунологических и патофизиологических реакций (Grell, M. et al. (1995), Cell, 83: 793-802).

Растворимый ФНО α образуется посредством расщепления трансмембранного белка-предшественника (Kriegler et al. (1988), Cell, 53: 45-53), и секретлируемые полипептиды массой 17 килодальтон (кДа) собираются в растворимые гомотримерные комплексы (Smith et al. (1987), J. Biol. Chem., 262: 6951-6954; Butler et al. (1986), Nature, 320:584; Old (1986), Science, 230: 630). Затем эти комплексы связываются с рецепторами, находящимися на множестве клеток. Связывание обеспечивает ряд провоспалительных эффектов, включая

- (i) высвобождение других провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-6, IL-8 и IL-1;
- (ii) высвобождение матриксных металлопротеиназ; и
- (iii) усиление экспрессии эндотелиальных молекул адгезии, дополнительно усиливая воспалительные и иммунный каскады, привлекая лейкоциты во внесосудистые ткани.

Существует множество нарушений, ассоциированных с повышенными уровнями ФНО α . Например, показано, что экспрессия ФНО α повышается при ряде заболеваний человека, включая такие хронические заболевания, как ревматоидный артрит (RA), воспалительные нарушения кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит, сепсис, застойную сердечную недостаточность, бронхиальную астму и рассеянный склероз. ФНО α также обозначают как провоспалительный цитокин.

Физиологически ФНО α также ассоциирован с защитой от конкретных инфекций (Cerami et al. (1988), Immunol. Today, 9: 28). ФНО α высвобождают макрофаги, активированные липополисахаридами грамотрицательных бактерий. По существу ФНО α , по-видимому, является очень важным эндогенным медиатором, вовлеченным в развитие и патогенез эндотоксического шока, ассоциированного с бактериальным сепсисом.

Адалимумаб (Хумира (Humira®), AbbVie, Inc.) представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело IgG1 человека, специфичное к ФНО человека. Это антитело также известно как D2E7. Адалимумаб состоит из 1330 аминокислот, описан и запатентован в патенте США № 6090382 (международная заявка WO 9729131); описание адалимумаба, таким образом, включено в качестве ссылки полностью. Как правило, адалимумаб получают посредством технологии рекомбинантных ДНК в экспрессирующей системе с клетками млекопитающего, такими как, например, клетки китайского хомяка. Адалимумаб специфически связывается с ФНО и нейтрализует биологические функции ФНО, блокируя его взаимодействие с рецепторами ФНО p55 и p75 на клеточной поверхности.

В данной области известны различные составы адалимумаба (см., например, международные заявки WO 2004016286 и WO 2012065072).

В WO 2004016286 описана жидкая композиция для стабилизации антител, применяемых для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающая антитело, например адалимумаб, буферную систему, полисорбат и средства для поддержания изотоничности раствора, например маннитол и хлорид натрия. В композиции используется цитрат-фосфатный буфер (состав Хумира 1). Вышеуказанный состав имеет ряд недостатков, таких как

- 1) недостаточная коллоидная стабильность антитела в высоких концентрациях;
- 2) недостаточная стабильность в условиях теплового стресса; а также
- 3) агрегация при длительном хранении.

В WO 2012065072 описана жидкая композиция для стабилизации антител, применяемых для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающая антитело, например адалимумаб, а также маннитол, полисорбат 80 (состав Хумира 2). Вышеуказанный состав имеет ряд недостатков, таких как

- 1) выраженная нестабильность при замораживании и размораживании; и
- 2) низкая температура агрегации.

Таким образом, существует потребность в создании нового лекарственного препарата, содержащего антитело, который связывает ФНО α , например адалимумаб.

Изобретение относится к стабильным водным композициям, содержащим адалимумаб, которые обеспечивают его длительное хранение, а также легко переносят заморозку-разморозку и термический стресс.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к водной фармацевтической композиции для внутривенного или подкожного введения, которая содержит

- а) адалимумаб в концентрации от 50 до 200 мг/мл;

- b) натрий ацетат тригидрат в концентрации от 0.4 до 1.2 мг/мл;
- с) трегалозу в концентрации от 25 до 150 мг/мл, и/или пролин в концентрации от 5 до 40 мг/мл, или трегалозу в концентрации 25 до 150 мг/мл и аргинин в концентрации от 0.05 до 0.5 мг/мл;
- d) полисорбат 20 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл, полисорбат 80 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл или полоксамер 188 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл либо их комбинацию, где композиция имеет pH от 5 до 6.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 200 мг/мл адалимумаба, от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0-6.0, от 0.1 до 1 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 80.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 200 мг/мл адалимумаба, от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0-6.0, от 0.1 до 1 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 0.5 мг/мл полисорбата 20.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 200 мг/мл адалимумаба, от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата, от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина, уксусную кислоту лед. до pH 5.0-6.0, от 0.1 до 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В некоторых вариантах композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающему введение вышеуказанных композиций в эффективном количестве, где заболевание, опосредованное ФНО α , выбирают из активного ревматоидного артрита среднетяжелой или тяжелой степени, активного псориатического артрита, активного анкилозирующего спондилита, хронического бляшечного псориаза среднетяжелой или тяжелой степени, язвенного колита среднетяжелой или тяжелой степени, аксиального спондилоартрита, активного гнойного гидраденита, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона среднетяжелой или тяжелой степени, увеита, активного энтезит-ассоциированного артрита.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению вышеуказанных композиций для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , где заболевание выбирают из активного ревматоидно-

го артрита среднетяжелой или тяжелой степени, активного псориатического артрита, активного анкилозирующего спондилита, хронического бляшечного псориаза среднетяжелой или тяжелой степени, язвенного колита среднетяжелой или тяжелой степени, аксиального спондилоартрита, активного гнойного гидраденита, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона среднетяжелой или тяжелой степени, увеита, активного энтезит-ассоциированного артрита.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения вышеуказанных композиций, который включает добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов с последующим добавлением в любой последовательности следующих компонентов: осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы трегалозы, пролина, аргинина или их сочетания, адалимумаба, поверхностно-активного вещества, выбранного из группы полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или их сочетания.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг. 2. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг. 3. Зависимость оптической плотности растворов при 400 нм от концентрации ПЭГ 6000 после приготовления.

Фиг. 4. Точка агрегации адалимумаба в ацетатном буферном растворе, pH 5.0. T_{ag} 74.0°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, kcps.

Фиг. 5. Точка агрегации адалимумаба в цитратном буферном растворе, pH 5.0. T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, kcps.

Фиг. 6. Точка агрегации адалимумаба в гистидиновом буферном растворе, pH 6.0. T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, kcps.

Фиг. 7. Точка агрегации адалимумаба в фосфатном буферном растворе, pH 6.0. T_{ag} 71.0°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, kcps.

Фиг. 8. Точка агрегации адалимумаба в составе Хумира 1, pH 5.2. T_{ag} 69.5°C. Темно-серый: Z-average, нм, светло-серый: интенсивность, kcps.

Описание изобретения

Определения и общие методы.

Термины, используемые в настоящем описании, как правило, имеют их обычные для данной области значения в пределах контекста изобретения и в конкретном контексте, где используют каждый термин. Ниже или в другом месте описания определены некоторые термины, которые используют для описания изобретения, для предоставления практики дополнительного руководства в отношении описания изобретения. Приведены синонимы некоторых терминов. Изложение одного или нескольких синонимов не исключает использование других синонимов. Использование примеров в любом месте настоящего описания, включая примеры любых терминов, описываемых в настоящем документе, является исключительно иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем и значение изобретения или любого иллюстрируемого объекта. Изобретение не ограничено различными вариантами осуществления, приведенными в настоящем описании.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области, к которой принадлежит изобретение. В случае конфликта руководствоваться следует настоящим документом, включая определения.

Термин "ФНО α человека", который также известен как hTNF α , или hTNF, или TNF α , предназначен для обозначения цитокина человека, который существует в виде секретируемой формы массой 17 кДа и мембраноассоциированной формы массой 26 кДа, биологически активная форма которого состоит из тримера нековалентно связанных молекул массой 17 кДа. Структура ФНО α дополнительно описана, например, в Pennica, D. et al. (1984), Nature, 312: 724-729; Davis, J.M. et al. (1987), Biochemistry, 26: 1322-1326; и Jones, E.Y. et al. (1989), Nature, 338: 225-228. Термин rhTNF α человека предназначен для включения рекомбинантного ФНО α человека, который можно получать стандартными способами рекомбинантной экспрессии или приобрести коммерчески (R&D Systems, каталожный № 210-ТА, Minneapolis, Minn.).

Термин "длительное хранение" или "долговременная стабильность" следует понимать, как обозначение того, что фармацевтическая композиция может храниться в течение трех месяцев или более, в течение шести месяцев или более и предпочтительно в течение одного года или более, наиболее предпочтительно, с минимальным сроком хранения в стабильном состоянии по меньшей мере два года. В общем термины "длительное хранение" и "долговременная стабильность" дополнительно включают продолжительности хранения в стабильном состоянии, которые по меньшей мере сравнимы или лучше, чем срок хранения в стабильном состоянии, как правило, необходимый для доступных в настоящее время коммерческих составов адалимумаба без потерь в стабильности, которые могут сделать состав непригодным для определенного для него фармацевтического применения. Длительное хранение также следует понимать,

как обозначение того, что фармацевтическую композицию хранят или в виде жидкости при 2-8°C, или замораживают, например, при -18°C или менее. Также предусмотрено, что композицию можно замораживать и размораживать не менее одного раза.

Термин "стабильное состояние" в отношении длительного хранения следует понимать, как означающий, что адалимумаб, содержащийся в фармацевтических композициях, теряет не более 20%, или более предпочтительно 15%, или даже более предпочтительно 10%, а наиболее предпочтительно 5% своей активности относительно активности композиции в начале хранения.

Термин "эксципиент" или "вспомогательное вещество" используется в данном документе для описания любого ингредиента, отличающегося от ранее описанных по данному изобретению.

Термин "сахар" относится к моносахаридам, дисахаридам и полисахаридам или их смесям.

Термин "полиол" в том виде, как он здесь использован, относится к эксципиенту с множеством гидроксильных групп и включает сахарные спирты и сахарные кислоты.

Термин "буфер", "буферная композиция", "буферный агент" в том виде, как он здесь использован, относится к добавляемой композиции, которая дает возможность жидкому препарату антителя проявлять устойчивость к изменениям pH. Когда делается ссылка на концентрацию буфера, подразумевается то, что указанная концентрация представляет собой суммарную молярную концентрацию свободной кислотной и свободной основной формы данного буфера.

Термины "агент, регулирующий тоничность" или "агент, контролирующий тоничность", а также "осмолитик" или "осмотический агент" в том виде, как они здесь использованы, относятся к эксципиенту, который может подводить осмотическое давление жидкого препарата антителя. В определенных воплощениях агент, регулирующий тоничность, может подводить осмотическое давление жидкого препарата антителя до изотоничного так, что данный препарат антителя является физиологически совместимым с клетками ткани организма субъекта. "Изотоничный" препарат представляет собой препарат, который имеет осмотическое давление, эквивалентное человеческой крови. Изотоничные препараты обычно имеют осмотическое давление от примерно 250 до 350 мОсм.

Термин "поверхностно-активное вещество" (другое название сурфактант, или детергент, или ПАВ) в том виде, как он здесь использован, относится к эксципиенту, который может изменять поверхностное натяжение жидкого препарата антителя. В определенных воплощениях данное поверхностно-активное вещество снижает поверхностное натяжение жидкого препарата антителя. В других воплощениях "поверхностно-активное вещество" может способствовать улучшению коллоидной стабильности или растворимости любого антителя в данном препарате. Поверхностно-активное вещество может снижать агрегацию приготовленного препарата антителя, и/или минимизировать образование частиц в данном препарате, и/или уменьшать адсорбцию. Поверхностно-активное вещество также может улучшать стабильность антителя во время, в том числе после замораживания/оттаивания и при встряхивании.

Термин "лиофилизированный", используемый в настоящем документе, относится к препарату, который был подвергнут процессу, известному в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающему в себя замораживание препарата и последующее удаление льда из замороженного содержимого.

Термин "аминокислота", используемый в настоящем документе, означает аминокислоту (свободную аминокислоту, т.е. не аминокислоту в пептиде или в белковой последовательности).

"Фармацевтическая композиция" обозначает композицию, включающую в себя антители согласно изобретению и по крайней мере один из компонентов, выбранных из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых наполнителей, растворителей, разбавителей, носителей, вспомогательных, распределяющих, средств доставки.

"Лечить", "лечение" и "терапия" относятся к методу смягчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов.

В одном аспекте субъект лечения или пациент является млекопитающим, предпочтительно человеческим субъектом. Вышеупомянутый субъект может быть мужского или женского пола любого возраста.

"Терапевтически эффективным количеством" считается количество вводимого в процессе лечения терапевтического агента, которое избавит в определенной степени от одного или нескольких симптомов заболевания, по поводу которого проводится лечение.

В настоящем описании и в последующей формуле изобретения, если контекстом не предусмотрено иное, слова "иметь", "включать" и "содержать" или их вариации, такие как "имеет", "имеющий", "включает", "включающий", "содержит" или "содержащий", следует понимать, как включение указанного целого или группы целых, но не исключение любого другого целого или группы целых.

Подробное описание изобретения

Водная композиция.

Настоящее изобретение относится к новым, улучшенным водным композициям адалимумаба для внутривенного или подкожного введения. Указанная композиция адалимумаба по изобретению позволяет предотвратить образование агрегатов адалимумаба, получить устойчивость к заморозке-разморозке, устойчивость к термическому стрессу при 50°C при длительном исследовании, устойчивость к шейк-тесту при длительном исследовании, а также сохранить эффективность и стабильность адалимумаба в

течение длительного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления адалимумаб представлен в терапевтическом количестве, достигающем до 200 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 150 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 1 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет от примерно 50 мг/мл до примерно 100 мг/мл. В еще более предпочтительном варианте осуществления терапевтическое количество составляет примерно 100 мг/мл.

Рассматриваемая водная композиция включает ацетатный буфер, который состоит из натрия ацетата тригидрата в сочетании с уксусной кислотой.

В некоторых вариантах осуществления натрия ацетата тригидрат представлен в количестве, достигающем до 1.2 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет от примерно 0.4 мг/мл до примерно 1.2 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет от примерно 0.4 мг/мл до примерно 0.5 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество натрия ацетата тригидрата составляет 0.436 мг/мл.

Жидкая композиция по изобретению сохраняет величину pH в диапазоне примерно от 5.0 до 6.0. В более предпочтительном варианте осуществления величина pH сохраняется на уровне примерно 5.5.

Указанная водная композиция включает подходящие поверхностно-активные вещества, которые являются фармацевтически приемлемыми эксципиентами, используемыми для защиты белковых композиций от различных стрессовых воздействий, таких как перемешивание, сдвигающее усилие, высокая температура, замораживание и т.д. Подходящие поверхностно-активные вещества включают полисорбаты, или полоксамеры, или комбинацию полисорбата и полоксамера. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом является полисорбат. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом являются полоксамер. В предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом являются комбинация полисорбата и полоксамера. В более предпочтительном варианте осуществления полисорбат представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80 (в том числе продаваемые под торговой маркой Tween® 20 или Tween® 80). В более предпочтительном варианте осуществления полоксамер представляет собой полоксамер 188 (в том числе продаваемый под торговой маркой Kolliphor P188®). В другом предпочтительном варианте осуществления подходящим поверхностно-активным веществом является комбинация полисорбата 20/полисорбата 80 и полоксамера 188.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 20 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 20 составляет примерно 0.5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбата 80 составляет примерно 0.5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления полоксамер 188 представлен в количестве, достигающем до 10 мг/мл. В предпочтительном варианте осуществления количество полоксамера 188 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полоксамера 188 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полоксамера 188 составляет примерно 1.0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления комбинация полисорбат 20/полисорбата 80 и полоксамера 188 представлена в количестве, достигающем до 10 мг/мл полисорбата 80 и до 10 мг/мл полоксамера 188. В предпочтительном варианте осуществления количество полоксамера 188 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл и количество полисорбат 20/полисорбата 80 составляет от примерно 0.05 мг/мл до примерно 10 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полоксамера 188 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл и количество полисорбат 20/полисорбата 80 составляет от примерно 0.1 мг/мл до примерно 1 мг/мл. В более предпочтительном варианте осуществления количество полисорбат 20/полисорбата 80 составляет примерно 0.5 мг/мл и количество полоксамера 188 составляет примерно 1.0 мг/мл.

Водная композиция включает один или несколько подходящих стабилизаторов, которые являются фармацевтически приемлемыми эксципиентами и которые защищают фармацевтически активный ингредиент от химической и/или физической деградациии в процессе производства, хранения и применения. В одном из вариантов осуществления подходящим стабилизатором является трегалоза. В другом варианте осуществления подходящим стабилизатором является пролин. В другом варианте осуществления подхо-

варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 80 мг/мл трегалозы дигидрата, 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1 мг/мл полоксамера 188. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 27 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1.0 мг/мл полоксамера 188. В более предпочтительном варианте осуществления композиция содержит от 50 до 150 мг/мл адалимумаба, 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата, 40 мг/мл трегалозы дигидрата, 13.5 мг/мл пролина, уксусную кислоту лед. до pH 5.5, 1.0 мг/мл полоксамера 188.

Указанная композиция может, кроме того, дополнительно включать один или несколько других подходящих эксципиентов, которые хорошо известны специалистам в данной области.

Указанные выше композиции пригодны для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция сохраняет стабильность при хранении в том смысле, что в ней не происходит каких-либо дальнейших процессов агрегации белка или его модификаций в сравнении с показателем стабильности в нулевой временной точке.

Способы лечения и применение водной композиции.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения млекопитающего, включающему введение млекопитающему терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций по изобретению, где у млекопитающего может присутствовать заболевание или нарушение, которые можно эффективно лечить адалимумабом.

В предпочтительном варианте осуществления млекопитающее представляет собой человека.

Заболевания или нарушения, которые можно лечить фармацевтической композицией по изобретению, выбирают из активного ревматоидного артрита среднетяжелой или тяжелой степени, активного псориатического артрита, активного анкилозирующего спондилита, хронического бляшечного псориаза среднетяжелой или тяжелой степени, язвенного колита среднетяжелой или тяжелой степени, аксиального спондилоартрита, активного гнойного гидраденита, ювенильного идиопатического артрита, болезни Крона среднетяжелой или тяжелой степени, увеита, активного энтезит-ассоциированного артрита.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить нуждающемуся в лечении индивидууму посредством системной инъекции, например посредством внутривенной, или подкожной, или внутримышечной инъекции; или посредством инъекции или нанесения на соответствующий участок, например посредством прямой инъекции или прямого нанесения на участок, когда участок доступен при хирургическом вмешательстве; или посредством местного применения.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения и/или профилактики ревматоидного артрита, включающему введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества одной из предоставляемых композиций адалимумаба.

Терапевтически эффективное количество адалимумаба в композициях по изобретению зависит от состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, предшествующей терапии и истории болезни пациента и реакции на терапевтическое средство. Подходящую дозу можно регулировать по решению лечащего врача так, что ее можно вводить пациенту один раз или посредством нескольких введений.

В одном из вариантов осуществления эффективное количество адалимумаба на дозу для взрослого составляет приблизительно от 1-500 мг/м², или приблизительно 1-200 мг/м², или приблизительно 1-40 мг/м², или приблизительно 5-25 мг/м².

Альтернативно можно вводить постоянную дозу, количество которой может находиться в диапазоне 2-500, 2-100 мг/дозу или приблизительно 10-80 мг/дозу.

Если дозу следует вводить более одного раза в неделю, иллюстративный диапазон доз является таким же, как указанные выше диапазоны доз или менее, и ее предпочтительно вводят два или более раз в неделю с диапазоном доз 25-100 мг/дозу.

В другом варианте осуществления приемлемая доза для введения посредством инъекции содержит 80-100 мг/дозу или альтернативно содержит 80 мг на дозу.

Дозу можно вводить раз в неделю, раз в две недели или разделять несколькими неделями (например, от 2 до 8).

В одном из вариантов осуществления адалимумаб вводят в дозе 40 мг посредством одной подкожной (п/к) инъекции.

В некоторых случаях улучшения состояния пациента можно добиться посредством введения дозы фармацевтической композиции приблизительно до 100 мг от одного до трех раз в неделю в течение периода по меньшей мере трех недель. Для достижения желаемой степени улучшения может быть необходимым лечение в течение более длительных периодов. Для неизлечимых хронических состояний схему лечения можно продолжать бессрочно. Для пациентов детского возраста (возраст 4-17 лет) подходящая схема лечения может включать введение дозы адалимумаба от 0.4 до 4 мг/кг один или несколько раз в неделю.

В другом варианте осуществления фармацевтические составы по изобретению можно получать в виде нерасфасованного состава, и по существу компоненты фармацевтической композиции присутству-

ют в количествах выше, чем может требоваться для введения, и их соответствующим образом разбавляют до введения.

Фармацевтические композиции можно вводить в виде одного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами по мере необходимости. Таким образом, в одном из вариантов осуществления предоставляемые способы лечения и/или профилактики используют в комбинации с введением терапевтически эффективного количества другого активного средства. Другое активное средство можно вводить до, в течение или после введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Другое активное средство можно вводить как часть предоставляемой композиции или альтернативно в виде отдельного состава.

Введение предоставляемых фармацевтических композиций можно проводить различными способами, включая парентеральное, пероральное, буккальное, назальное, ректальное, интраперитонеальное, интрадермальное, трансдермальное, подкожное, внутривенное, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрижелудочковое, внутричерепное, внутритрахеальное, интратекальное введение, внутримышечную инъекцию, внутривитреальную инъекцию и местное введение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению особенно пригодны для парентерального введения, т.е. подкожно, внутримышечно, внутривенно, интраперитонеально, в спинной мозг, в суставы, интрасиновиально и/или интратекально. Парентеральное введение можно проводить посредством болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Фармацевтические композиции для инъекций могут находиться в стандартной лекарственной форме, например в ампулах, флаконах, преднаполненных шприцах или в контейнерах с несколькими дозами с добавленным консервантом, но не ограничиваясь этим. Кроме того, разработан ряд недавних подходов к доставке лекарственного средства и фармацевтические композиции по настоящему изобретению подходят для введения этими новыми способами, например Inject-ease®, Genject®, ручки-инжекторы, такие как GenPen®, и безыгольные устройства, такие как MediJector® и BioJector®. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению также можно адаптировать для еще не открытых способов введения. Также см. Langer, 1990, Science, 249: 1527-1533.

Предоставляемые фармацевтические композиции также можно формулировать в качестве депонированного препарата. Такие длительно действующие составы можно вводить посредством имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или посредством внутримышечной инъекции. Таким образом, например, составы можно модифицировать с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле), или ионообменных смол, или в виде умеренно растворимых производных, например в виде умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции при желании можно предоставлять во флаконе, упаковке или в устройстве-распределителе, которые могут содержать одну или несколько стандартных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном из вариантов осуществления устройство-распределитель может содержать шприц, содержащий однократную дозу жидкого состава, готового к инъекции. Шприц может сопровождаться инструкцией по введению.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору или контейнеру, содержащим водную фармацевтическую композицию по изобретению. Концентрация адалимумаба в водной фармацевтической композиции может варьировать в широком диапазоне, но, как правило, в пределах диапазона приблизительно от 1 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл водного состава. Набор также может сопровождаться инструкциями по применению.

Способ получения.

Способ получения вышеуказанных композиций включает добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов с последующим добавлением в любой последовательности следующих компонентов: осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы: трегалозы, пролина, аргинина или их сочетания, адалимумаба, поверхностно-активного вещества, выбранного из группы: полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или их сочетания.

Методики.

1. Определение концентрации белка в исследуемых образцах.

Концентрацию белка определяли с помощью метода УФ-спектрофотометрии при длине волны 280 нм в планшетах для УФ-спектрофотометрии.

Каждый образец разводили раствором соответствующего плацебо до концентрации ~0.5 мг/мл. В лунку планшета для УФ-спектрофотометрии помещали 150 мкл разведенного образца. Измеряли оптическую плотность помещенных в планшет растворов на планшетном спектрофотометре при длине волны 280 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий раствор плацебо.

Концентрацию белка (C) в мг/мл рассчитывали по формуле

$$C = \frac{A(280) * b}{\epsilon * l}$$

A_{280} - значение оптической плотности при длине волны 280 нм;

ϵ - коэффициент экстинкции исследуемого белка;

b - суммарный коэффициент разведения образца;

1 - толщина слоя в лунке планшета; для 150 мкл $l=0.42$ см.

2. Замена буферного раствора и концентрирование образцов.

Диафильтрацию и концентрирование образцов проводили в концентрационных ячейках Stirred Cell (Millipore) под давлением.

3. "ПЭГ-агрегация".

Приготовление растворов ПЭГ 6000.

Готовили раствор ПЭГ 6000 с массовой концентрацией 20-25% в исследуемом составе вспомогательных веществ. Итоговые растворы фильтровали через фильтр Durapore 0.45 мкм.

В 96-луночные планшеты для УФ-спектрофотометрии переносили расчетное количество образца, раствора вспомогательных веществ и 20-25% раствора ПЭГ 6000 так, чтобы в каждой лунке была концентрация ПЭГ6000 от 0 до 18%, а концентрация белка в каждой лунке составляла 1 мг/мл. Все полученные в лунках растворы хорошо перемешивали, пипетируя.

После этого оценивали степень мутности растворов визуально, а также измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 400 нм. Чем менее стабилен образец, тем при меньшей концентрации ПЭГ 6000 он будет образовывать видимые агрегаты (опалесценцию). Степень мутности растворов также оценивали через сутки или несколько дней после приготовления растворов.

4. Определение гомогенности и точки агрегации белка с помощью метода динамического светорассеяния (DLS).

Определение гомогенности исследуемых образцов осуществляли на приборе Zetasizer Nano ZSP в режиме измерения Size. Для этого 0.05 мл раствора помещали в обеспыленную одноразовую пластиковую кювету.

Аналитическая модель: Protein analysis.

Выдерживание при температуре перед началом измерения 30 с.

В каждой точке среднее значение по 13 измерениям в 3 повторностях. Определение точки агрегации исследуемых белков осуществляли на приборе Zetasizer Nano ZSP. Для этого раствор помещали в кварцевую обеспыленную кювету, которую постепенно нагревали в приборе при постоянном измерении интенсивности рассеянного света в режиме измерения Temperature trend.

Аналитическая модель: Protein analysis.

Режим Temperature trend, mod: Protein aggregation point. От 50 до 85°C при шаге нагрева 1.5°C.

Выдерживание при температуре перед началом измерения 30 с.

В каждой точке среднее значение по 15 измерениям в 1 повторности.

Строили температурный тренд с помощью ПО прибора, которое и автоматически рассчитывает точку агрегации белка (Aggregation point).

5. Определение термической стабильности методом "Термостресс 50°C".

Исследуемые образцы разделяли на 2 части и помещали в отдельные пробирки: по 1 пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в термостат и инкубировали при 50°C в течение указанного времени. После окончания прогрева пробирки убирала из термостата, выдерживали при комнатной температуре около 15 мин и передавали на анализ согласно спецификации.

6. Определение коллоидной стабильности методом "шейк-тест".

Исследуемые образцы разделяли на 2 части по 200 мкл и помещали в стеклянные виалы по 1 виале на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в термощейкер и шейкировали со скоростью 800 об/мин при температуре 2-8°C в течение указанного времени. После окончания стресса пробирки убирала из термощейкера и передавали на анализ согласно спецификации.

7. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования.

Исследуемые образцы разделяли на 2 части и помещали в полимерные пробирки: по 1 пробирке на каждый состав откладывали в холодильник на хранение при +4°C, остальные устанавливали в морозильную камеру и хранили при температуре минус 16-20°C в течение указанного времени. После окончания стресса пробирки убирала из морозильной камеры, выдерживали при комнатной температуре до полного оттаивания содержимого, перемешивали растворы с помощью Vortex и передавали на анализ согласно спецификации.

8. Определение чистоты образцов с помощью метода эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (Э ВЭЖХ).

Колонка Tosoh TSK-GelG3000SW_{XL} 7.8 mm ID×30 cm, cat. № 08541.

Температура колонки: 25°C.

Скорость потока подвижной фазы: 0.7 мл/мин.

Объем вкола: 20 мкл.

Концентрация образца: 5 мг/мл.

Длина волны детектора: 220 нм.

Продолжительность элюирования: 23 мин.

Подвижная фаза: динатрия гидрофосфат б/в 7.1 мг/мл.

Натрия хлорид 17.54 мг/мл.

pH подвижной фазы доводили до 7.0 ортофосфорной кислотой.

9. Определение кислотно-щелочного профиля образцов на приборе Caliper LabChip GX II.

9.1. Приготовление образцов.

Образцы разводили до концентрации 1 мг/мл. К 200 мкл полученного раствора вносили 2 мкл раствора карбоксипептидазы В (СрВ) с концентрацией 5 мг/мл. Перемешивали и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C. Испытуемые образцы отдиализовывали против трех смен воды в центрифужных пробирках Amicon Ultra и концентрировали до 2 мг/мл.

9.2. Приготовление рабочих растворов.

Рабочие растворы и планшет с анализируемыми образцами готовили в соответствии с методикой от производителя с использованием набора NT Protein Charge Variant Labeling Kit.

9.3. Подготовка чипа.

Подготовку чипа и пробирки с буфером проводили по методике от производителя с использованием буферных растворов из набора Protein Charge Variant Buffer Kit.

Запуск анализа является стандартной операцией. Метод анализа Protein Charge Variant 68s.

10. Определение чистоты образцов на приборе Caliper Labchip GX II в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

10.1. Приготовление анализируемых образцов.

Для приготовления денатурирующего и восстанавливающего растворов использовали по 700 мкл NT Protein Express Sample Buffer с добавлением 24.5 мкл 1М DTT для буфера в редуцирующих условиях и 24.5 мкл 1 М IAM для буфера в нередуцирующих условиях. Образцы разводили до концентрации 2 мг/мл. Для каждого образца готовили две микропробирки: в одну вносили 35 мкл денатурирующего буфера, в другую - 35 мкл восстанавливающего буфера. Денатурировали образцы при 100°C в течение 5 мин. Перемешивали пробирки на вортексе, затем вносили 70 мкл воды в каждую пробирку и перемешивали. В 96-луночный планшет для анализа переносили по 44 мкл каждого образца.

10.2. Приготовление рабочих растворов и заполнение чипа.

Приготовление рабочих растворов и подготовку чипа проводили по стандартной методике с использованием набора NT Protein Express Reagent Kit. Запуск анализа является стандартной операцией. Метод анализа NT Protein Express 200.

11. Определение кислотно-щелочного профиля образцов с помощью ионно-обменной (ИО) ВЭЖХ.

Колонка:	DIONEX ProPack WCX-10 4 x 250 мм (Tosoh bioscience, Japan);
Предколонка:	Dionex ProPack WCX-10G
Подвижная фаза:	Элюент А: 0.01 М 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (МЭСК), pH 6,0 Элюент В: 0.01 М МЭСК, 0.4 М натрия хлорид, pH 5.5;
Объемвводимой пробы:	40 мкл;
Скорость потока:	0.5 мл/мин;
Температура колонки:	25°C;
Температура автосамплера:	5°C;
Длина волны детектора:	280 нм.
Градиент:	Фаза А 95 – 0 – 95 %.

12. Определение чистоты методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

Готовили ПААГ в стеклянных пластинах в присутствии натрия додецилсульфата, состоящие из концентрирующего слоя - 4% ПААГ и разделяющего слоя: в редуцирующих условиях - 12.5% ПААГ, в нередуцирующих условиях - 8% ПААГ.

Собирали и устанавливали электрофорезную камеру в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора для проведения вертикального электрофореза. Пробу готовили, разводя образцы очищенной водой до конечной концентрации 1 мг/мл. Отбирали объем, эквивалентный 40 мкг, и смешивали подготовленные пробы исследуемого образца в соотношении 3:1 (объем/объем) с буферным раствором для нанесения образцов 4-кратным, содержащим 2-меркаптоэтанол (редуцирующие условия) и не содержащим 2-меркаптоэтанол (нередуцирующие условия), перемешивали. Полученные растворы инкубировали при температуре (99±1)°C в течение 3 мин (образцы, содержащие 2-меркаптоэтанол) и при температуре (99±1)°C в течение 1 мин (образцы, не содержащие 2-меркаптоэтанол). Растворы охлаждали до комнатной температуры, перемешивали и наносили в лунки ПААГ под слой электродного буферного раствора.

Электрофорез проводили в режиме постоянного тока, используя систему водяного охлаждения. Задавали параметры работы источника питания: при прохождении фронта красителя через концентрирующий гель напряжение тока составляло 110 В. После вхождения фронта красителя в нижний разделяющий

гель на 5-7 мм напряжение тока увеличивали до 180 В. Источник питания отключали, когда фронт красителя достиг нижней границы геля.

После окончания электрофореза гели отделяли от стекол и проводили фиксацию белков в фиксирующем растворе в течение 16-18 ч при комнатной температуре. Затем проводили окрашивание гелей (в растворе кислотном синем 83) и отмывку до получения четкой визуализации полос. Гели сканировали. Чистоту и примеси в испытуемых образцах оценивали с помощью программного обеспечения GelPro.

13. Определение специфической активности.

Специфическую активность образцов оценивали по способности специфично связывать и нейтрализовать ФНО α , который, в свою очередь, обладает цитотоксическим эффектом и вызывает гибель культуры WENI-13 var (фибросаркома, *Mus musculus*), вариантом культуры, который обладает повышенной чувствительностью к ФНО α в присутствии Актиномицина Д. Пробоподготовку образцов проводили с использованием роботизированной станции TecanEvo 200 в качестве СКО (среда количественного определения) использовали RPMI1640, 2 mM Gln, 10%FBS, актиномицин Д 2.5 мкг/мл, гентамицин 5 мкг/мл.

Исследуемый образец антитела разводили до 50 мкг/мл с шагом разведения не более 20 и помещали в роботизированную станцию. С помощью TecanEvo200 в культуральных планшетах проводили подготовку трех независимых разведений СО и ИО в диапазоне 10000-0.5 нг/мл, к подготовленным разведениям вносили раствор ФНО α 500 пг/мл. Полученную смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 1 ч.

После инкубации вносили клеточную суспензию WENI-13 var $(0,5 \pm 0,1) \times 10^6$ кл/мл. Планшеты помещали в СО $_2$ инкубатор и инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5% СО $_2$ в увлажненном воздухе в течение 20-24 ч.

По истечении срока инкубации вносили в культуральные планшеты витальный краситель Аламар Синий и инкубировали планшеты при тех же условиях до развития окраски. Оценивали интенсивность флуоресценции при длине волны возбуждения/испускания 544/590 нм при помощи прибора для считывания Infinite M200Pro. С помощью программного обеспечения Magellan 7.2 проводили построение кривых зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка; оценивали параллельность полученных кривых. Относительную специфическую активность исследуемых образцов определяли, как соотношение ED50 стандартного образца к ED50 испытуемого, выраженное в процентах.

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было довольно подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Примеры

Пример 1. Выбор природы буферного раствора.

Исследуемые составы.

В настоящем исследовании выбраны четыре буферных раствора, а также оригинальные составы препарата Хумира (для составов с содержанием белка 50 и 100 мг/мл) в качестве контроля.

Хумира 1	Динатрия гидрофосфата дигидрат	1.530 мг/мл
	Натрия дигидрофосфата дигидрат	0.860 мг/мл
	Маннитол	12.0 мг/мл
	Лимонной кислоты моногидрат	1.305 мг/мл
	Полисорбат 80	1.0 мг/мл
	Натрия цитрат	0.305 мг/мл
	Натрия хлорид	6.165 мг/мл
	Натрия гидроксид	до pH 5.2
Хумира 2	Маннитол	42.0 мг/мл
	Полисорбат 80	1.0 мг/мл
Acet, pH 5.0	Натрия ацетат т/г	0.436 мг/мл
	Уксусная кислота лед.	до pH 5.0
Cit, pH 5.0	Натрия цитрат д/г	0.932 мг/мл
	Лимонная кислота б/в	0.352 мг/мл
His, pH 6.0	L-гистидин	0.40 мг/мл
	Гистидина гидрохлорид м/г	0.40 мг/мл
PB, pH 6.0	Натрия дигидрофосфат м/г	1.21 мг/мл
	Натрия гидрофосфат б/в	0.17 мг/мл

1.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест "ПЭГ-агрегация" проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в табл. 1. Результаты также представлены на фиг. 1.

Таблица 1

Средняя оптическая плотность растворов после приготовления.

ПЭГ 6000, %	0 %	2 %	4 %	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %	18 %
Acet, pH 5.0	0.0597	0.0519	0.0531	0.0593	0.0590	0.0598	0.0502	0.0513	0.0591	0.0608
Cit, pH 5.0	0.0582	0.0620	0.0620	0.0639	0.6261	1.0340	1.4279	1.4765	1.3668	1.4133
His, pH 6.0	0.0583	0.0615	0.0621	0.0634	0.0637	0.0664	0.0781	0.9847	1.3367	1.5626
PВ, pH 6.0	0.0598	0.0619	0.0654	0.0656	0.0712	0.9003	1.3453	1.5324	1.4662	1.4297
Хумира 1	0.0563	0.0583	0.0594	0.0614	0.3005	0.9315	1.1182	1.3925	1.3980	1.4120
Хумира 2	0.0605	0.0579	0.0608	0.0834	0.0845	0.0685	0.0673	0.0658	0.0803	0.1320

Наблюдается видимая агрегация

1.2. Определение термической стабильности по точке агрегации белка методом динамического светорассеяния (DLS).

Анализ выполнен согласно методике 4. Результаты представлены в табл. 2 и на фиг. 4-8.

1.3. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5. Результаты представлены в табл. 2.

1.4. Результаты.

Таблица 2

Сводные результаты по выбору природы буферного раствора

Состав	Термостресс 50°C, 24 ч		Видимая агрегация при ПЭГ 6000 % (Вид СФ)	Точка агрегации, °C (DLS)
	Прирост примесей, % (Э ВЭЖ)	Прирост фрагментов, % (Э ВЭЖ)		
Концентрация белка	5 мг/мл		1 мг/мл	
Acet, pH 5.0	0.02	0.01	> 18	74.0
Cit, pH 5.0	1.50	0.08	8	69.5
His, pH 6.0	0.75	0.20	14	69.5
PВ, pH 6.0	0.55	0.11	10	71.0
Хумира 1	0.38	0.15	8	69.5
Хумира 2	0.02	0.01	> 18	72.5

положительные результаты отрицательные результаты средние результаты

1.5. Выводы по примеру 1.

По результатам настоящего исследования рекомендуемый состав хранения (без учета дополнительных вспомогательных веществ).

Acet, pH 5.0	Натрия ацетат т/г 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0
--------------	--

Данный состав показал наилучшие стабилизирующие свойства среди всех исследуемых образцов: наименьший прирост примесей в ходе термостресса (0.02% наравне с составом Хумира 2), отсутствие агрегации при 18% ПЭГ 6000, а также самое высокое значение температуры агрегации (74°C).

Адалimumаб в составе Хумира 1 обладает меньшей термической стабильностью по сравнению с рекомендуемым составом. Минимальная коллоидная и термическая стабильность отмечена для состава на основе 5 мМ цитратного буферного раствора с pH 5.0.

Пример 2. Оптимизация pH и буферной емкости композиции.

По результатам первой части исследования наилучшую стабильность адалimumаб показал в ацетатном буферном растворе с pH 5.0. Как показал уровень техники, большинство патентов и патентных заявок на фармацевтические композиции, содержащие адалimumаб, защищают растворы с pH от 4.0 до 8.0. Таким образом, целью настоящего раздела было исследование возможности получения стабильных композиций, содержащих ацетат-ионы, с pH менее 4.

Исследуемые составы.

Обозначение	Концентрация, мМ	pH
Acet 5 мМ pH 6	5	6.0
Acet 5 мМ pH 5.5	5	5.5
Acet 5 мМ pH 5	5	5.0
Acet 5 мМ pH 4	5	4.0
Acet 5 мМ pH 3.75	5	3.75
Acet 5 мМ pH 3.5	5	3.5
Acet 10 мМ pH 6	10	6.0
Acet 10 мМ pH 5.5	10	5.5
Acet 10 мМ pH 5	10	5.0
Acet 10 мМ pH 4	10	4.0
Acet 10 мМ pH 3.75	10	3.75
Acet 10 мМ pH 3.5	10	3.5
Acet 20 мМ pH 6	20	6.0
Acet 20 мМ pH 5.5	20	5.5
Acet 20 мМ pH 5	20	5.0
Acet 20 мМ pH 4	20	4.0
Acet 20 мМ pH 3.75	20	3.75
Acet 20 мМ pH 3.5	20	3.5

2.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест "ПЭГ-агрегация" проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в табл. 3. Результаты также представлены на фиг. 2.

Таблица 3

Средняя оптическая плотность (400 нм) растворов после приготовления

ПЭГ 6000, %	Acet 5 мМ pH 6	Acet 5 мМ pH 5.5	Acet 5 мМ pH 5	Acet 5 мМ pH 4	Acet 5 мМ pH 3.75	Acet 5 мМ pH 3.5	Acet 10 мМ pH 6	Acet 10 мМ pH 5.5	Acet 10 мМ pH 5	Acet 10 мМ pH 4
0 %	0.0341	0.0344	0.0299	0.0303	0.0312	0.0285	0.0365	0.0314	0.0289	0.0290
6 %	0.0346	0.0341	0.0293	0.0294	0.0290	0.0288	0.0315	0.0316	0.0316	0.0296
8 %	0.0344	0.0342	0.0290	0.0291	0.0295	0.0289	0.0355	0.0322	0.0312	0.0289
10 %	0.0346	0.0331	0.0298	0.0298	0.0297	0.0296	0.0344	0.0331	0.0299	0.0296
12 %	0.0348	0.0338	0.0302	0.0313	0.0319	0.0358	0.0371	0.0318	0.0303	0.0295
14 %	0.0361	0.0346	0.0313	0.0327	0.0331	0.0327	0.0367	0.0316	0.0313	0.0326
16 %	0.0359	0.0341	0.0341	0.0331	0.0333	0.0329	0.0346	0.0316	0.0339	0.0334
18 %	0.0348	0.0350	0.0308	0.0308	0.0310	0.0310	0.0344	0.0355	0.0307	0.0314
ПЭГ 6000, %	Acet 10 мМ pH 3.75	Acet 10 мМ pH 3.5	Acet 10 мМ pH 3.5	Acet 20 мМ pH 6	Acet 20 мМ pH 5.5	Acet 20 мМ pH 5	Acet 20 мМ pH 4	Acet 20 мМ pH 3.75	Acet 20 мМ pH 3.5	
0 %	0.0281	0.0292	0.0292	0.0344	0.0310	0.0295	0.0289	0.0289	0.0289	
6 %	0.0292	0.0288	0.0288	0.0346	0.0322	0.0289	0.0304	0.0294	0.0285	
8 %	0.0299	0.0337	0.0337	0.0381	0.0328	0.0292	0.0307	0.0296	0.0298	
10 %	0.0295	0.0306	0.0306	0.0346	0.0316	0.0295	0.0291	0.0302	0.0312	
12 %	0.0319	0.0321	0.0321	0.0346	0.0318	0.0300	0.0308	0.0301	0.0308	
14 %	0.0309	0.0331	0.0331	0.0398	0.0320	0.0322	0.0312	0.0315	0.0306	
16 %	0.0306	0.0320	0.0320	0.0361	0.0310	0.0325	0.0321	0.0315	0.0320	
18 %	0.0313	0.0313	0.0313	0.0356	0.0311	0.0322	0.0321	0.0324	0.0362	

2.2. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

2.3. Определение коллоидной стабильности методом шейк-тест.

Анализ выполнен согласно методике 6.

2.4. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования.

Анализ выполнен согласно методике 7.

Общие результаты представлены в табл. 4, где наглядно отражены показатели качества образцов до и после термостресса, шейк-теста и криоконцентрирования.

2.5. Результаты.

Таблица 4

Сводные результаты показателей качества образцов до и после стрессов

	Входной контроль				
	рН плацебо	рН после диализа	Δ рН после диализа	С белка, мг/мл	Мутность, ОП 400 нм Вид-СФ
5 mM acet рН 6.0	6.00	6.10	0.10	10	0.0506
10 mM acet рН 6.0	6.00	6.06	0.06	10	0.0531
20 mM acet рН 6.0	6.00	6.04	0.04	10	0.0511
5 mM acet рН 5.5	5.50	5.60	0.10	10	0.0513
10 mM acet рН 5.5	5.50	5.53	0.03	10	0.0531
20 mM acet рН 5.5	5.50	5.51	0.01	10	0.0514
5 mM acet рН 5.0	5.00	5.15	0.15	10	0.0504
10 mM acet рН 5.0	5.00	5.12	0.12	10	0.0501
20 mM acet рН 5.0	5.00	5.09	0.09	10	0.0488
5 mM acet рН 4.0	4.00	4.35	0.35	10	0.0446
10 mM acet рН 4.0	4.00	4.22	0.22	10	0.0471
20 mM acet рН 4.0	4.00	4.20	0.20	10	0.0489
5 mM acet рН 3.75	3.75	4.04	0.29	10	0.0504
10 mM acet рН 3.75	3.75	4.01	0.26	10	0.0501
20 mM acet рН 3.75	3.75	3.95	0.20	10	0.0473
5 mM acet рН 3.5	3.50	3.90	0.40	10	0.0511
10 mM acet рН 3.5	3.50	3.84	0.34	10	0.0476
20 mM acet рН 3.5	3.50	3.79	0.29	10	0.0492

положительные результаты
 отрицательные результаты
 средние результаты / исходные данные

Таблица 5

Δ рН*	Термостресс 50°C, 96 ч					Шейк-тест 300 об./мин, 96ч						
	Изменение чистоты*, %			Мутность, 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**	Δ рН*	Изменение чистоты*, %			Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**	
	Э ВЭЖ	Caliper Э+, ред.	Caliper Э+, неред.	Вид-СФ	Caliper		Э ВЭЖ	Caliper Э+, ред.	Caliper Э+, неред.	Вид-СФ	Caliper	
5 mM acet рН 6.0	0.03	+0.58	-1.88	-0.81	0.0446	28.11	0.03	-0.26	-0.49	+0.03	0.0490	2.56
10 mM acet рН 6.0	0.04	+0.56	-1.99	-0.94	0.0479	32.34	0.05	-0.31	-0.87	+0.19	0.0471	3.41
20 mM acet рН 6.0	0.01	+0.74	-2.09	-1.59	0.0487	33.09	0.02	-0.38	-0.96	+0.21	0.0468	3.98
5 mM acet рН 5.5	0.05	+0.87	-1.74	-1.01	0.0455	25.41	0.04	-0.22	-0.95	+0.58	0.0413	1.88
10 mM acet рН 5.5	0.06	+0.76	-1.61	-0.76	0.0489	26.19	0.06	-0.28	-0.87	+0.51	0.0482	1.55
20 mM acet рН 5.5	0.03	+0.88	-2.33	-0.81	0.0494	28.88	0.09	-0.31	-0.79	+0.69	0.0460	1.48
5 mM acet рН 5.0	0.00	+0.54	-1.98	-1.13	0.0506	26.57	0.07	-0.33	-1.17	+0.49	0.0480	2.45
10 mM acet рН 5.0	0.05	+0.79	-2.06	-0.97	0.0517	22.04	0.06	-0.50	-1.05	+0.56	0.0499	3.22
20 mM acet рН 5.0	0.02	+0.91	-0.65	-1.90	0.0527	32.92	0.03	-0.51	-0.29	+0.21	0.0520	7.02
5 mM acet рН 4.0	0.04	-2.00	-2.67	-0.59	0.0494	33.07	0.05	-0.24	-1.49	+2.05	0.0466	1.51
10 mM acet рН 4.0	0.03	-2.57	-2.55	-1.63	0.0507	32.88	0.07	-0.29	-0.91	+0.48	0.0505	3.44
20 mM acet рН 4.0	0.03	-2.85	-1.28	+0.99	0.0521	30.75	0.01	-0.40	+1.34	+0.85	0.0497	2.80
5 mM acet рН 3.75	0.01	-3.32	-5.00	-2.63	0.0492	29.11	0.07	-0.42	+1.38	-1.41	0.0488	0.99
10 mM acet рН 3.75	0.02	-3.09	-2.62	-2.50	0.0488	30.85	0.10	-0.31	-0.19	+0.67	0.0492	1.23
20 mM acet рН 3.75	0.01	-4.09	-2.36	-3.23	0.0535	30.95	0.06	-0.51	+12.11	+0.37	0.0504	0.87
5 mM acet рН 3.5	0.00	-4.28	-5.50	-2.72	0.0489	28.10	0.08	-0.38	-1.19	+1.03	0.0468	0.76
10 mM acet рН 3.5	0.02	-4.61	-6.22	-2.88	0.0494	32.07	0.10	-0.38	-0.01	+0.50	0.0471	3.78
20 mM acet рН 3.5	0.05	-6.87	-7.32	-3.11	0.0500	38.64	0.02	-0.67	+0.63	+1.01	0.0498	2.67

	Заморозка -20°C, разморозка +25°C					
	Δ pH*	Изменение чистоты, %*			Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**
		Э ВЭЖХ	Caliper ЭФ, ред.	Caliper ЭФ, неред.	Вид-СФ	Caliper
5 mM acet pH 6.0	-0.06	-0.24	-0.44	-0.21	0.0487	3.11
10 mM acet pH 6.0	-0.09	-0.31	-0.74	-0.38	0.0493	3.54
20 mM acet pH 6.0	0.04	-1.23	-0.59	-0.36	0.0511	4.11
5 mM acet pH 5.5	-0.09	-0.39	-0.56	-0.31	0.0486	2.66
10 mM acet pH 5.5	-0.07	-0.60	-0.41	-0.28	0.0473	2.19
20 mM acet pH 5.5	-0.06	-0.45	-0.09	-0.41	0.0480	4.01
5 mM acet pH 5.0	-0.05	-0.20	-0.46	-0.39	0.0494	2.67
10 mM acet pH 5.0	-0.01	-0.49	-0.87	+1.09	0.0466	4.46
20 mM acet pH 5.0	0.01	-0.59	-0.08	-0.09	0.0536	3.69
5 mM acet pH 4.0	-0.09	-1.29	-0.75	+0.99	0.0475	2.06
10 mM acet pH 4.0	0.00	-1.77	-2.11	-0.79	0.0440	3.18
20 mM acet pH 4.0	-0.04	-1.62	+0.73	+0.72	0.0513	4.54
5 mM acet pH 3.75	-0.05	-1.49	-1.74	-0.01	0.0463	3.07
10 mM acet pH 3.75	-0.02	-1.76	-1.68	+0.70	0.0473	3.02
20 mM acet pH 3.75	0.00	-2.16	+2.42	+1.03	0.0544	4.70
5 mM acet pH 3.5	-0.04	-1.22	-2.09	+0.72	0.0479	2.60
10 mM acet pH 3.5	0.07	-1.97	-1.59	+0.07	0.0492	6.83
20 mM acet pH 3.5	-0.06	-2.98	-1.13	+1.02	0.0427	4.88

* Изменение рассчитывали по формуле Δ = (значение после стресса – значение до стресса)

** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле Δ = [содержание кисл. фракций до стресса – содержание кисл. фракций после стресса] + [содержание щел. фракций до стресса – содержание щел. фракций после стресса] + [содержание доминир. фракции до стресса – содержание доминир. фракции после стресса]

■ положительные результаты ■ отрицательные результаты □ средние результаты / исходные данные

2.6. Выводы по примеру 2.

В результате исследования показано, что присутствие адалимумаба в кислых растворах плацебо приводит к значительному увеличению уровня pH. Помимо этого, композиции с pH менее 5.0 продемонстрировали неудовлетворительную стабильность в ходе диализа (низкая чистота на Labchip Caliper в ре-дуцирующих условиях) и термостресса (низкая чистота после стресса на всех используемых методах анализа).

Наиболее стабильным образцом среди всех исследуемых является адалимумаб в 5 mM ацетатном буферном растворе с pH 5.0-6.0. Они продемонстрировали минимальное изменение чистоты, а также кислотно-щелочного профиля в ходе стрессов. Однако для создания композиции адалимумаба возможно использование растворов с большей буферной емкостью.

Пример 3. Выбор осмотического агента и стабилизаторов.

По результатам первой части исследования наилучшую стабильность адалимумаб показал в ацетатном буферном растворе с pH 5.0-6.0. Состав с pH 5.5 был взят за основу для выбора осмотического агента и стабилизаторов.

Исследуемые составы.

Хумира 1	Динатрия гидрофосфата дигидрат 1.530 мг/мл Натрия дигидрофосфата дигидрат 0.860 мг/мл Маннитол 12.0 мг/мл Лимонной кислоты моногидрат 1.305 мг/мл Полисорбат 80 1.0 мг/мл Натрия цитрата дигидрат 0.305 мг/мл Натрия хлорид 6.165 мг/мл Натрия гидроксид до pH 5.2
Хумира 2	Маннитол 42.0 мг/мл Полисорбат 80 1.0 мг/мл
Acet, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5
Acet + NaCl, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Хлорид натрия 9 мг/мл
Acet + Tre, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг/мл
Acet + Suc, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Сахароза 100 мг/мл

042700

Acet + Mannitol, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Маннитол 50 мг/мл
Acet + Sorb, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Сорбитол 50 мг/мл
Acet + 100mM Gly , pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Глицин 7.5 мг/мл
Acet + 50 mM Arg, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Аргинина гидрохлорид 10.5 мг/мл
Acet + 10 mM Meth, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Метионин 1.5 мг/мл
Acet + 250 mM ProI, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 L-Пролин 27.0 мг/мл
Acet + 10 mM EDTA, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 ЭДТА динатриевая соль дигидрат 3.72 мг/мл
Acet + 100mM Lys, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Лизин 14.6 мг/мл
Acet + 100mM Guan, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Гуанидина гидрохлорид 9.55 мг/мл
Acet + 100mM Glu, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Глюкозы моногидрат 19.82 мг/мл
Acet + 100mM Lact, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Лактозы моногидрат 36.03 мг/мл
Acet + 100mM Mannose, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Манноза 18.02 мг/мл
Acet + Tre + 0. Cyst, pH 5.5	Натрия ацетат тригидрат 0.436 мг Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг Цистеина гидрохлорид моногидрат 0.088 мг
Acet + Tre + 2. Cyst, pH 5.5	Натрия ацетат тригидрат 0.436 мг Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Трегалозы дигидрат 100 мг Цистеина гидрохлорид моногидрат 0.44 мг
Acet + 10mM Cyst, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Цистеина гидрохлорид моногидрат 1.76 мг/мл
Acet + Tween20 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 20 0.5 мг/мл
Acet + Tween20 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 20 1.0 мг/мл
Acet + Tween80 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 80 0.5 мг/мл

Acet + Tween80 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полисорбат 80 1.0 мг/мл
Acet + Pol.188 0.5, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полоксамер 188 0.5 мг/мл
Acet + Pol.188 1.0, pH 5.5	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.5 Полоксамер 188 1.0 мг/мл

3.1. Определение коллоидной стабильности методом ПЭГ-агрегации.

Тест "ПЭГ-агрегация" проводили в трех повторностях для каждого образца. Анализ выполнен согласно методике 3. Данные средней оптической плотности растворов представлены в табл. 6. Результаты также представлены на фиг. 3.

Таблица 6

Средняя оптическая плотность растворов адалимумаба после приготовления

ПЭГ %	0.5 Tween 20	1 Tween 20	0.5 Tween 80	1 Tween 80	0.5 Pol.188	1 Pol.188	NaCl	Tre	Mann	Sorb	Suc
0	0.0648	0.0638	0.0714	0.0733	0.0588	0.0599	0.0737	0.0599	0.0699	0.0599	0.0621
6	0.0632	0.0654	0.0687	0.0755	0.0552	0.0566	0.0570	0.0638	0.0664	0.0614	0.0649
8	0.0620	0.0658	0.0654	0.0769	0.0590	0.0565	0.0622	0.0661	0.0652	0.0582	0.0646
10	0.0674	0.0670	0.0700	0.0776	0.0644	0.0669	0.2339	0.0630	0.0600	0.0615	0.0696
12	0.0649	0.0671	0.0704	0.0754	0.0650	0.0673	0.7066	0.0663	0.0637	0.0611	0.0700
14	0.0660	0.0709	0.0704	0.0819	0.0668	0.0710	1.2027	0.0733	0.0633	0.0618	0.0727
16	0.0663	0.0703	0.1049	0.1479	0.0687	0.0660	1.2339	0.0660	0.0620	0.0623	0.0733
18	0.0674	0.0707	0.1230	0.1681	0.0689	0.0773	1.2754	0.0621	0.0658	0.0620	0.0760
ПЭГ %	Gly	Arg	Meth	ProI	EDTA	Lys	Guan	Glu	Lact	Mannose	10Cyst
0	0.0611	0.0863	0.0581	0.0650	0.0561	0.0698	0.0636	0.0529	0.0693	0.0582	0.0616
6	0.0613	0.0613	0.0567	0.0696	0.0573	0.0697	0.0525	0.0565	0.0610	0.0601	0.0650
8	0.0646	0.0614	0.0620	0.0722	0.0584	0.0723	0.0606	0.0563	0.0623	0.0613	0.0670
10	0.0682	0.0700	0.0676	0.0734	0.6958	0.0765	0.0565	0.0573	0.0650	0.0633	0.0733
12	0.0710	0.0687	0.0645	0.0798	1.0355	0.0855	0.2242	0.0593	0.0663	0.0612	0.0708
14	0.0726	0.0769	0.0657	0.0837	1.0964	0.8867	0.9060	0.0611	0.0663	0.0638	0.0836
16	0.0739	0.9483	0.0676	0.0863	1.2935	1.2942	1.3112	0.0618	0.0668	0.0630	0.0758
18	0.0777	1.2383	0.0775	0.0869	1.3199	1.4338	1.4138	0.0585	0.0673	0.0657	0.0728

Наблюдается видимая агрегация

3.2. Определение термической стабильности по точке агрегации белка методом динамического светорассеяния (DLS).

Анализ выполнен согласно методике 4.

3.3. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

3.4. Результаты.

Таблица 7

Сводные результаты показателей качества образцов до и после стрессов

	С белка, мг/мл	Термостресс 50°C, 72 ч				Температура агрегации, °C	Агрегац. при % ПЭГ 6000	Вывод
		Изменение чистоты, %*	Прирост фрагментов, %*	Мутность, ОП 400 нм	Кисл.-Щел. профиль. Δ абс. %**			
Хумира 1	5	-1.10	0.94	0.0544	21.44	69.5***	8	
Хумира 2	5	-0.10	0.10	0.0487	18.38	72.5	> 18	
Acet	5	-0.46	0.43	0.0464	17.01	74.0	16	
Acet + NaCl	5	-2.03	1.86	0.0457	22.05	66.5***	10	
Acet + Tre	5	-0.28	0.15	0.0581	14.55	75.5	> 18	+
Acet + Suc	5	-0.46	0.34	0.0505	19.78	74.0	> 18	
Acet + Mannitol	5	-0.48	0.30	0.0521	19.03	75.5	> 18	
Acet + Sorb	5	-0.53	0.34	0.0574	20.78	75.5	> 18	
Acet + 100mM Gly	5	-0.39	0.20	0.0457	20.70	74.0	> 18	+
Acet + 50 mM Arg	5	-1.31	1.15	0.0497	14.90	69.5***	16	+
Acet + 10 mM Meth	5	-0.42	0.3\	0.0432	16.27	-	> 18	+
Acet + 250 mM Prol	5	-0.30	0.27	0.0440	15.43	74.0	> 18	+
Acet + 10 mM EDTA	5	-1.24	0.72	0.0488	12.08	68.0***	10	
Acet + 100mM Lys	5	-3.26	2.19	0.0424	17.67	68.0***	14	
Acet + 100mM Guan	5	-3.98	2.36	0.0480	17.51	66.5***	12	
Acet + 100mM Glu	5	-1.60	1.54	0.0496	55.64	74.0	> 18	
Acet + 100mM Lact	5	-1.86	1.60	0.0457	29.43	74.0	> 18	
Acet + 100mM Mannose	5	-1.73	1.57	0.0450	44.16	74.0	> 18	
Acet + 0. Cyst	5	-5.08	3.55	0.0425	-	-	-	
Acet + 2. Cyst	5	-8.99	5.78	0.0440	-	-	-	
Acet + 10mM Cyst	5	-100	93.20	0.0467	-	-	> 18	
Acet + Tween20 0.5	5	-	-	0.0425	19.25	74.0***	> 18	+
Acet + Tween20 1.0	5	-0.41	0.33	0.0452	20.72	74.0***	> 18	+
Acet + Tween80 0.5	5	-0.46	0.30	0.0475	19.52	72.5***	> 18	+
Acet + Tween80 1.0	5	-0.48	0.31	0.0436	17.36	72.5***	> 18	+
Acet + Koll 0.5	5	-0.31	0.30	0.0452	17.65	74.0	> 18	+
Acet + Koll 1.0	5	-0.40	0.44	0.0487	19.46	74.0	> 18	+

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$

*** Наблюдается заметная агрегация при нагревании (резкий скачок размера частиц и интенсивности рассеянного света > 10000 кcps).

положительные результаты
 отрицательные результаты
 средние результаты / исходные данные

3.5. Выводы по примеру 3.

На основании результатов настоящего исследования перспективными вспомогательными веществами для композиций адалимумаба являются: трегалозы дигидрат, глицин, пролин, метионин и аргинина гидрохлорид. В качестве поверхностно-активных веществ для скрининга финальной фармацевтической композиции взяты: полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 188.

Негативное влияние на коллоидную стабильность адалимумаба оказывают: хлорид натрия, аргинин, ЭДТА, лизин, гуанидин.

Негативное влияние на термическую стабильность адалимумаба оказывают: хлорид натрия, лизин, гуанидин. К полной фрагментации антитела приводит содержание в составе цистеина. Отмечено смещение кислотно-щелочного профиля белка при введении в состав вспомогательного вещества ЭДТА.

Пример 4. Выбор финальной фармацевтической композиции.

По результатам третьей части исследования в качестве перспективных вспомогательных веществ были выбраны: трегалозы дигидрат, глицин, пролин, метионин и аргинина гидрохлорид. В качестве поверхностно-активных веществ для скрининга финальной фармацевтической композиции взяты: полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 188.

Исследуемые составы (мг/мл).

№	Буферный раствор	Конц. белка	Трегалозы д/г	L-Пролин	Глицин	Метионин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 198	Аргинина г/х	
1		15	Состав Хумира 1 (см. п. 1)								
2		15	Состав Хумира 2 (см. п. 1)								
3	Ацетатный буферный раствор, рН 5.5	15	80								
4		15	80				0.1				
5		15	80				0.5				
6		15	80				1.0				
7		15	80					0.1			
8		15	80					1.0			
9		15	80						0.1		
10		15	80						0.5		
11		15	80						1.0		
12		15	80							0.5	
13		15	80				0.1			0.5	
14			15	80				0.5			0.5
15			15	80				1.0			0.5
16	15		80					0.1		0.5	
17	15		80					1.0		0.5	
18	15		80						0.1	0.5	
19	15		80						0.5	0.5	
20	15		80						1.0	0.5	
21			15		27						
22			15		27			0.1			
23			15		27			0.5			
24			15		27			1.0			
25			15		27				0.1		
26		15		27				1.0			
27		15		27					0.1		
28		15		27						0.5	
29		15		27						1.0	
30		15		8.0	7.5						
31		15		8.0	7.5		0.1				
32		15		8.0	7.5		0.5				
33		15		8.0	7.5		1.0				
34		15		8.0	7.5			0.1			
35		15		8.0	7.5			1.0			
36		15		8.0	7.5				0.1		
37		15		8.0	7.5					0.5	
38		15		8.0	7.5					1.0	
39		15		27			1.5				
40		15		27			1.5	0.1			
41		15		27			1.5	0.5			
42		15		27			1.5	1.0			
43		15		27			1.5		0.1		
44		15		27			1.5		1.0		
45		15		27			1.5			0.1	
46		15		27			1.5			0.5	
47		15		27			1.5			1.0	
48		15	40	13.5							
49		15	53.3	9.0							
50		15	26.7	18							

4.1. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

4.2. Определение коллоидной стабильности методом шейк-тест. Анализ выполнен согласно методике 6.

4.3. Определение коллоидной стабильности методом криоконцентрирования. Анализ выполнен согласно методике 7.

Общие результаты представлены в табл. 8 и 9, где отражены показатели качества образцов до и после термостресса, шейк-теста и криоконцентрирования.

4.4. Результаты.

Таблица 8

Сводные результаты Э ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии образцов до и после стрессов

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл									Изменение чистоты Э ВЭЖХ, %*			Мутность, ОП 400 нм		
	anti фНОα	Трегалоза д/г	L-Пролин	Глицин	Метионин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Долоксамер 188	Аргинина г/ж	Термостресс, 50°С, 120 ч	Заморозка -18°С, разморозка +25°С	Шейк-тест 120 ч	Шейк-тест 120 ч	Заморозка -18°С, разморозка +25°С	
1	15	Состав Хумира 1 (см. п. 1)									-1.12	0.02	0.03	0.0410	0.0501
2	15	Состав Хумира 2 (см. п. 1)									-0.38	-7.49	0.02	0.0408	0.0503
3	15	80								-0.33	0.04	0.03	0.0409	0.0521	
4	15	80				0.1				-0.34	-0.09	-0.09	0.0446	0.0479	
5	15	80				0.5				-0.35	-0.04	-0.02	0.0406	0.0531	
6	15	80				1.0				-0.38	-0.04	-0.21	0.0407	0.0489	
7	15	80					0.1			-0.39	0.05	0.07	0.0413	0.0474	
8	15	80					1.0			-0.44	0.07	-0.01	0.0454	0.0465	
9	15	80						0.1		-0.54	0.02	-0.07	0.0465	0.0494	
10	15	80						0.5		-0.45	-0.09	-0.18	0.0465	0.0516	
11	15	80						1.0		-0.56	-0.04	0.05	0.0412	0.0494	
12	15	80							0.1	-0.40	-0.03	0.08	0.0448	0.0446	
13	15	80				0.1			0.1	-0.44	0.03	-0.07	0.0479	0.0468	
14	15	80				0.5			0.1	-0.46	-0.09	-0.09	0.0445	0.0510	
15	15	80				1.0			0.1	-0.49	-0.01	0.07	0.0434	0.0512	
16	15	80					0.1		0.1	-0.47	0.05	0.08	0.0445	0.0455	
17	15	80					1.0		0.1	-0.33	0.04	0.07	0.0478	0.0444	
18	15	80						0.1	0.1	-0.46	0.09	0.05	0.0497	0.0447	
19	15	80						0.5	0.1	-0.48	-0.01	0.01	0.0441	0.0518	
20	15	80						1.0	0.1	-0.40	-0.01	0.03	0.0434	0.0470	
21	15		27							-0.36	0.00	0.02	0.0400	0.0409	
22	15		27			0.1				-0.51	-0.03	-0.06	0.0440	0.0475	
23	15		27			0.5				-0.78	-0.03	-0.04	0.0464	0.0745	
24	15		27			1.0				-0.39	0.03	0.01	0.0445	0.0443	
25	15		27				0.1			-0.46	-0.01	0.08	0.0412	0.0457	
26	15		27				1.0			0.48	0.07	0.07	0.0434	0.0476	
27	15		27					0.1		-0.66	-0.09	0.00	0.0445	0.0449	
28	15		27					0.5		-0.36	-0.04	0.06	0.0410	0.0469	
29	15		27					1.0		-0.39	0.02	0.06	0.0409	0.0501	
30	15		8.0	7.5						-0.46	-0.02	0.00	0.0402	0.0467	
31	15		8.0	7.5		0.1				-0.48	-0.05	-0.01	0.0403	0.0439	
32	15		8.0	7.5		0.5				-0.40	-0.04	-0.01	0.0412	0.0496	
33	15		8.0	7.5		1.0				-0.20	0.02	0.08	0.0555	0.0474	
34	15		8.0	7.5			0.1			-0.46	-0.01	-0.03	0.0585	0.0479	
35	15		8.0	7.5			1.0			-0.37	0.01	-0.02	0.0565	0.0443	
36	15		8.0	7.5				0.1		-0.49	-0.02	0.04	0.0408	0.0457	
37	15		8.0	7.5				0.5		-0.36	-0.01	0.06	0.0478	0.0464	
38	15		8.0	7.5				1.0		-0.31	0.00	0.03	0.0432	0.0498	
39	15		27		1.5					-0.36	0.01	-0.01	0.0512	0.0463	
40	15		27		1.5	0.1				-0.38	0.06	0.05	0.0509	0.0503	
41	15		27		1.5	0.5				-0.36	-0.01	0.08	0.0549	0.0417	
42	15		27		1.5	1.0				-0.30	0.01	0.04	0.0520	0.0473	

43	15		27		1.5		0.1			-0.37	0.00	-0.08	0.0512	0.0444
44	15		27		1.5		1.0			-0.32	-0.03	0.03	0.0513	0.0465
45	15		27		1.5			0.1		-0.33	-0.01	-0.03	0.0510	0.0411
46	15		27		1.5			0.5		-0.36	-0.02	-0.02	0.0550	0.0477
47	15		27		1.5			1.0		-0.32	0.01	-0.03	0.0552	0.0498
48	15	40	13.5							-0.50	-0.09	-0.08	0.0494	0.0469
49	15	53.3	9.0							-0.55	-0.01	0.03	0.0414	0.0464
50	15	26.7	18							-0.59	-0.02	-0.03	0.0410	0.0466

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$

■ положительные результаты □ отрицательные результаты □ средние результаты / исходные данные

Таблица 9

Сводные результаты кислотно-щелочного профиля образцов на приборе LabChip к гомогенности методом динамического светорассеяния до и после стрессов

№	Состав вспомогательных веществ, мг/мл								Гомогенность DLS, % (по интенсивности)	Гомогенность DLS после стрессов, %			Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по модулю**, %			
	anti фНОα	Треталон Д/Г	L-Пролин	Глицин	Метионин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 188		Аргинина г/л	Термо-стресс, 50°C, 120 ч	Шейк-тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C	Термо-стресс, +50°C, 120 ч	Шейк-тест 120 ч	Заморозка -18°C, разморозка +25°C
1	15	Состав Хумира 1 (см. п. 1)								100	99.6	100	100	33.16	1.13	1.84
2	15	Состав Хумира 2 (см. п. 1)								98.8	96.0	100	80.1	29.55	1.03	2.88
3	15	80							100	100	93.3	100	24.56	2.88	2.46	
4	15	80				0.1			100	100	93.6	100	27.26			
5	15	80				0.5			100	100	94.8	100	28.27	1.09	2.82	
6	15	80				1.0			100	100	96.9	100	27.64			
7	15	80					0.1		100	100	97.0	100	24.10			
8	15	80					1.0		100	98.5	98.8	100	26.17			
9	15	80						0.1	100	100	98.6	100	26.26			
10	15	80						0.5	100	100	95.1	100	26.98	1.44	3.55	
11	15	80						1.0	100	97.6	98.9	100	26.13			
12	15	80						0.1	100	100	99.0	100	24.88	0.88	3.10	
13	15	80				0.1		0.1	100	100	100	100	25.58			
14	15	80				0.5		0.1	100	100	100	100	26.16	1.43	1.99	
15	15	80				1.0		0.1	99.4	100	100	100	24.96			
16	15	80					0.1	0.1	100	100	100	100	28.10			
17	15	80					1.0	0.1	100	100	100	100	24.74			
18	15	80					0.1	0.1	100	100	100	100	24.50			
19	15	80					0.5	0.1	100	100	100	100	24.55			
20	15	80						1.0	100	100	90.0	100	24.64	2.30	3.68	
21	15		26.5						100	100	100	100	26.79	1.03	1.20	
22	15		26.5			0.1			100	100	100	100	24.60			
23	15		26.5			0.5			100	100	100	100	21.96	1.85	2.49	
24	15		26.5			1.0			100	100	95.8	100	22.20			
25	15		26.5				0.1		100	100	100	100	24.22			
26	15		26.5				1.0		100	98.5	100	100	26.07			
27	15		26.5					0.1	100	100	100	100	22.38			
28	15		26.5					0.5	100	100	100	100	21.70	2.74	4.67	
29	15		26.5					1.0	100	100	100	100	21.16			
30	15		8.0	7.5					100	100	100	100	24.87	2.90	2.91	
31	15		8.0	7.5		0.1			100	100	100	100	29.76			
32	15		8.0	7.5		0.5			100	100	100	100	31.09	2.78	0.18	
33	15		8.0	7.5		1.0			100	100	100	100	29.96			
34	15		8.0	7.5			0.1		100	100	100	100	27.30			
35	15		8.0	7.5			1.0		100	100	100	100	32.39			
36	15		8.0	7.5				0.1	100	100	100	100	31.69			
37	15		8.0	7.5				0.5	100	100	100	100	29.55	2.49	0.49	
38	15		8.0	7.5				1.0	100	100	100	100	30.00			
39	15		26.5		1.5				100	100	100	100	28.52	1.44	1.62	
40	15		26.5		1.5	0.1			100	100	100	100	28.41			
41	15		26.5		1.5	0.5			100	100	100	100	28.16	1.09	0.79	

42	15		26.5		1.5	1.0				100	100	94.6	100	28.56		
43	15		26.5		1.5		0.1			100	100	92.0	100	33.88		
44	15		26.5		1.5		1.0			100	100	88.4	100	30.46		
45	15		26.5		1.5			0.1		100	100	95.4	100	26.82		
46	15		26.5		1.5			0.5		100	100	92.7	100	24.57	0.33	0.81
47	15		26.5		1.5			1.0		100	100	100	100	28.22		
48	15	40	13.5							100	100	90.7	100	26.85	1.74	0.77
49	15	53.3	9.0							100	100	100	100	26.58	1.33	4.37
50	15	26.7	18							100	100	99.9	100	26.73	0.42	5.87

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$

** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле

$\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$

■ положительные результаты ■ отрицательные результаты □ средние результаты / исходные данные

4.4. Выводы по примеру 4.

В результате исследования показано, что адалимумаб в составе Хумира 1 является наиболее термостабильным из всех исследуемых образцов. Термостресс 50°C в течение 120 ч приводит к максимальному приросту примесей (1.2%) на Э ВЭЖХ, а также к максимальному изменению кислотного-щелочного профиля (суммарное абсолютное изменение всех фракций более 33% на приборе LabChip Caliper). Коллоидная стабильность образца в составе Хумира 1 сравнима с альтернативными составами.

Состав Хумира 2 обладает сравнимой с альтернативными составами термической стабильностью (потеря чистоты в ходе термостресса 0.38%). Однако при заморозке-разморозке адалимумаба в данном составе происходит заметная агрегация белка: прирост агрегатов на эксклюзионной ВЭЖХ составляет более 7%, что делает непригодным применение препарата при его случайном замерзании. Заметный прирост примесей после заморозки также отмечен с помощью DLS.

Альтернативные составы на основе ацетатного буферного раствора с добавлением ряда вспомогательных веществ проявили хорошую термическую и коллоидную стабильность в ходе стрессов. Эксклюзионная ВЭЖХ не выявила разницы в приросте примесей данных составов. Также не выявлено значимого влияния поверхностно-активных веществ на стабильность адалимумаба в концентрации 15 мг/мл.

Анализ стрессированных образцов с помощью DLS показал, что присутствие в составе аргинина гидрохлорида снижает прирост примесей в ходе шейк-теста, а присутствие метионина повышает накопление примесей при шейкировании.

Минимальное изменение кислотного-щелочного профиля отмечено для составов 12-29 (составы, содержащие трегалозу и аргинина гидрохлорид, а также содержащие L-пролин). На основании результатов настоящего исследования перспективными составами для адалимумаба являются следующие.

Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл
Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Аргинина гидрохлорид 0.1 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 Трегалозы дигидрат 80 мг/мл Аргинина гидрохлорид 0.1 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл
Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 L-Пролин 27 мг/мл	Натрия ацетата тригидрат 0.436 мг/мл Уксусная кислота лед. до pH 5.0-6.0 L-Пролин 27 мг/мл Полисорбат 20 / Полисорбат 80 / Полоксамер 188 0.5 – 1.0 мг/мл

Пример 5. Подтверждение финальной фармацевтической композиции высококонцентрированного адалимумаба.

Для подтверждения стабильности рекомендуемых фармацевтических композиций адалимумаб в концентрации 50, 100 и 150 мг/мл был подвергнут термострессу при 50°C в течение 6 суток.

Исследуемые составы.

№	Буферный раствор	Конц. белка	Третагноза д/г	L-Пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полоксамер 188	Аргинина г/х	
1	Ацетатный буферный раствор, рН 5.0-6.0	50	Состав Хумира 1 (см. п. 1)						
2			Состав Хумира 2 (см. п. 1)						
3			80		0.5				0.1
4			80		1.0				0.1
5			80			0.5			0.1
6			80			1.0			0.1
7			80					0.5	0.1
8			80					1.0	0.1
9			80		0.5			0.5	0.1
10				27	0.5				
11				27	1.0				
12				27		0.5			
13				27		1.0			
14				27				0.5	
15				27				1.0	
16				27	0.5			0.5	
17		Состав Хумира 1 (см. п. 1)							
18		Состав Хумира 2 (см. п. 1)							
19		80		0.5				0.1	
20		80		1.0				0.1	
21		80			0.5			0.1	
22		80			1.0			0.1	
23		80					0.5	0.1	
24		80					1.0	0.1	
25		80		0.5			0.5	0.1	
26			27	0.5					
27			27	1.0					
28			27		0.5				
29			27		1.0				
30			27				0.5		
31			27				1.0		
32			27	0.5			0.5		
33	Ацетатный буферный раствор, рН 5.0-6.0	150	Состав Хумира 1 (см. п. 1)						
34			Состав Хумира 2 (см. п. 1)						
35			80		0.5				0.1
37			80		1.0				0.1
38			80			0.5			0.1
39			80			1.0			0.1
40			80					0.5	0.1
41			80					1.0	0.1
42			80		0.5			0.5	0.1
43				27	0.5				
44				27	1.0				
45				27		0.5			
46				27		1.0			
47				27				0.5	
48				27				1.0	
49				27	0.5			0.5	

5.1. Определение термической стабильности при длительном воздействии методом Термостресс 50°C.

Анализ выполнен согласно методике 5.

5.2. Результаты.

Таблица 10

Сводные результаты концентрированных образцов с рН 5.0 до и после стрессов

№	Конц. белка	Состав							Э ВЭХ		ИО ВЭХ			ПААГ электрофорез				Спец. активность			
		Триглицериды Д/г	L-Пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 188	Аргинина г/х	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после термостресса, 50°C, 144 ч*	Содержание фракций, %			Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50°C, 144 ч*		Активность до стресса	Значение после термостресса, 50°C, 144 ч			
										кисл.	осн.	щел.	Смывное изменение кислотно-щелочного профиля по модулю**, %	Ред.	Неред.	Ред.			Неред.		
1		Состав Хумира 1 (см. п. 1)							99.85	2.67	11.30	86.90	1.80	61.87	98.46	94.64	-1.68	-6.46	96	92	
2		Состав Хумира 2 (см. п. 1)							99.85	1.65	11.19	87.16	1.66	61.66	98.73	94.89	-1.46	-3.48	97	95	
3		80	0.5				0.1	99.30	1.55	11.48	86.88	1.65	64.49					-1.46	-2.69		92
4		80		1.0			0.1	99.04	1.62	9.59	88.92	1.49	68.05					-0.99	-2.46		93
5		80			0.5		0.1	99.38	1.79	11.46	86.85	1.69	62.11					-1.41	-3.19		91
6		80			1.0		0.1	99.34	1.72	11.89	86.80	1.31	63.01	97.99	94.16			-1.37	-3.49	94	90
7		80				0.5	0.1	99.48	1.54	11.02	87.38	1.60	63.66					-1.31	-3.10		91
8		80				1.0	0.1	99.45	1.62	11.02	87.58	1.40	64.68					-1.67	-3.79		91
9		80		0.5		0.5	0.1	99.35	1.66	11.09	86.97	1.94	63.79					-1.78	-3.91		90
10		27	0.5					99.29	1.76	11.27	87.19	1.55	62.47					-1.46	-3.49		97
11		27	1.0					99.93	1.81	11.43	87.03	1.54	62.11					-1.78	-2.41		96
12		27		0.5				99.44	1.69	11.41	87.18	1.41	62.46					-1.41	-2.46		94
13		27		1.0				99.65	1.79	11.98	86.53	1.49	62.41	98.10	94.78			-1.29	-3.01	96	93
14		27			0.5			99.41	1.72	11.95	86.42	1.63	60.36					-1.29	-2.64		94
15		27			1.0			99.22	1.58	11.40	87.15	1.44	62.77					-1.38	-2.04		95
16		27	0.5		0.5			99.03	1.79	11.46	87.00	1.54	64.66					-1.43	-3.14		93
17		Состав Хумира 1 (см. п. 1)							99.75	2.99	11.63	86.41	1.96	60.84	97.95	94.10	-1.46	-7.23	98	99	
18		Состав Хумира 2 (см. п. 1)							99.84	2.26	11.20	87.10	1.70	61.30	98.26	94.74	-1.68	-3.15	99	75	
19		80	0.5				0.1	99.26	2.01	10.63	87.77	1.60	64.94					-1.54	-2.86		91
20		80		1.0			0.1	99.90	2.48	9.55	89.06	1.40	69.09					-1.82	-4.52		84
21		80			0.5		0.1	99.30	2.06	11.46	87.04	1.50	65.03					-2.06	-4.61		89
22		80			1.0		0.1	99.10	2.09	11.98	86.39	1.63	65.87	98.38	94.11			-2.21	-4.13	98	84
23		80				0.5	0.1	99.38	2.01	11.15	87.25	1.61	63.18					-2.27	-4.06		81
24		80				1.0	0.1	99.29	2.36	10.85	87.57	1.58	65.63					-2.57	-4.28		86
25		80			0.5	0.5	0.1	99.41	2.46	11.86	86.98	1.16	63.64					-2.66	-4.49		88
26		27	0.5					99.08	2.21	11.21	87.31	1.48	62.43					-3.09	-4.25		91
27		27	1.0					99.95	1.87	10.62	87.82	1.57	60.90					-2.68	-3.44		87
28		27		0.5				99.43	2.62	11.41	86.93	1.66	64.13					-2.64	-3.46		89
29		27		1.0				99.46	2.49	11.32	86.90	1.78	63.89	98.35	94.09			-1.89	-3.49	97	88
30		27			0.5			99.28	2.48	10.99	87.31	1.71	62.47					-1.44	0.89		89
31		27			1.0			99.33	1.92	11.52	87.08	1.40	60.28					-0.84	-2.09		89
32		27	0.5		0.5			99.38	2.31	10.46	87.79	1.75	62.48					-1.98	-3.01		86
33		Состав Хумира 1 (см. п. 1)							99.88	3.22	11.45	86.73	1.82	59.91	98.29	94.64	-1.92	-6.61	99	98	
34		Состав Хумира 2 (см. п. 1)							99.72	2.81	11.19	87.16	1.65	60.64	98.43	94.06	-1.75	-7.52	99	101	
35		80	0.5				0.1	99.09	2.40	10.75	87.64	1.61	63.48					-1.82	-4.13		113
37		80		1.0			0.1	99.92	2.67	11.28	87.01	1.71	62.90					-2.00	-6.09		98
38		80			0.5		0.1	99.24	2.45	11.28	87.25	1.47	62.30					-2.28	-4.34		99
39		80			1.0		0.1	99.16	2.80	10.73	87.75	1.52	64.32	98.32	94.85			-2.70	-4.24	98	97
40		80				0.5	0.1	99.74	2.89	11.39	86.92	1.69	64.11					-2.20	-4.11		94
41		80				1.0	0.1	99.12	2.80	11.74	86.80	1.46	63.79					-2.67	-4.06		93
42		80		0.5		0.5	0.1	99.20	2.79	11.79	86.52	1.69	64.39					-2.78	-4.08		96
43		27	0.5					99.88	2.48	11.28	87.10	1.63	62.63					-3.13	-2.37		86
44		27	1.0					99.61	2.64	11.35	87.07	1.58	61.45					-2.92	-2.50		88
45		27		0.5				99.46	2.71	11.49	86.78	1.73	63.44					-2.01	-2.03		89
46		27		1.0				99.42	2.83	11.13	86.99	1.88	63.79	98.45	94.14			-2.03	-1.95	97	87
47		27			0.5			99.12	2.36	10.91	87.27	1.82	62.17					-1.45	0.52		86
48		27			1.0			99.12	2.52	11.30	87.14	1.57	61.01					-2.08	-1.73		92
49		27	0.5		0.5			99.42	2.80	11.98	86.56	1.46	61.09					-2.35	-1.79		91

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$ ** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле $\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$

■ положительные результаты □ отрицательные результаты □ средние результаты / исходные данные

Сводные результаты концентрированных образцов с рН 6,0 до и после стрессов

Состав							Э ВЭЖХ		ИО ВЭЖХ				ПААГ электрофорез				Спец. активность		
№	Комп. Белка	Триглицериды м/г	L-Пролин	Полисорбат 80	Полисорбат 20	Полюксамер 188	Аргинина г/л	Содержание мономера, %	Изменение чистоты после термостресса, 50°C 144 ч*	Содержание фракций, %			Суммарное изменение кислотно-щелочного профиля по модулю**, %	Содержание мономера, %		Изменение чистоты после термостресса, 50°C, 144 ч*		Активность до стресса	Значение после термостресса, 50°C, 144 ч
										кисл.	осн.	щел		Ред.	Неред.	Ред.	Неред.		
1								99.05	2.67	11.30	86.90	1.80	61.07	98.46	94.64	-1.60	-6.46	96	92
2								99.85	1.65	11.19	87.16	1.66	61.66	98.73	94.89	-1.46	-3.48	97	95
50		0.5					0.1	99.31	1.66	11.38	86.47	2.15	61.44			-1.66	-2.41		92
51		1.0					0.1	99.41	1.74	11.46	86.99	1.55	62.01			-1.45	-3.08		88
52				0.5			0.1	99.64	1.61	11.84	87.01	1.15	64.21			-1.11	-2.49		94
53				1.0			0.1	99.41	1.45	11.35	86.86	1.79	64.26	97.66	94.06	-1.65	-2.77	94	96
54					0.5	0.1		99.29	1.56	11.65	86.88	1.47	61.87			-1.82	-2.09		89
55					1.0	0.1		99.56	1.59	11.98	86.79	1.23	61.94			-1.97	-2.67		91
56		0.5			0.5	0.1		99.16	1.67	11.71	87.16	1.13	61.81			-1.19	-2.48		96
57		27	0.5					99.64	1.47	11.22	87.19	1.59	60.20			-0.88	-2.37		95
58		27	1.0					99.67	1.88	11.64	86.68	1.68	62.11			-0.91	-2.48		94
59		27		0.5				99.73	1.62	11.58	86.63	1.79	63.53			-1.19	-2.61		89
60		27		1.0				99.48	1.40	11.27	87.15	1.58	60.84	98.02	94.41	-1.41	-2.00	95	96
61		27			0.5			99.35	1.89	11.34	86.81	1.85	60.84			-1.06	-3.09		91
62		27			1.0			99.47	1.85	11.65	87.09	1.26	61.01			-0.94	-2.14		90
63		27	0.5			0.5		99.58	1.74	11.82	87.14	1.04	60.06			-1.23	-2.90		93
17								99.75	2.99	11.63	86.41	1.96	60.84	97.95	94.10	-1.46	-7.23	98	99
18								99.84	2.26	11.20	87.10	1.70	61.30	98.26	94.74	-1.68	-3.15	99	75
64		0.5					0.1	99.31	2.34	11.55	86.65	1.80	69.84			-1.35	-2.06		94
65		1.0					0.1	99.26	2.41	11.64	86.84	1.52	66.44			-1.82	-3.49		96
66				0.5			0.1	99.64	2.43	11.20	86.69	2.11	62.59			-2.31	-4.11		89
67				1.0			0.1	99.53	1.89	11.68	86.72	1.60	61.49	98.12	94.66	-2.48	-3.69	98	90
68					0.5	0.1		99.16	1.84	11.54	86.69	1.77	61.48			-2.64	-3.17		91
69					1.0	0.1		99.60	1.91	11.20	86.51	2.29	62.03			-2.41	-3.76		92
70		0.5			0.5	0.1		99.22	2.06	11.28	87.12	1.60	62.07			-2.37	-3.19		93
71		27	0.5					99.18	2.24	11.62	87.30	1.08	61.34			-3.11	-2.22		94
72		27	1.0					99.67	2.16	11.59	86.88	1.53	61.55			-2.46	-3.49		96
73		27		0.5				99.48	2.19	11.41	86.84	1.75	60.48			-2.80	-3.85		88
74		27		1.0				99.49	1.99	11.60	86.70	1.70	60.68	98.32	94.21	-1.42	-3.41	102	89
75		27			0.5			99.56	2.09	11.26	86.90	1.84	61.89			-0.84	-2.18		90
76		27			1.0			99.62	2.22	11.41	86.66	1.93	60.76			-0.98	-2.14		93
77		27	0.5			0.5		99.44	2.37	11.73	86.58	1.69	63.18			-1.49	-3.11		98
33								99.88	3.22	11.45	86.73	1.82	59.91	98.29	94.64	-1.92	-6.61	99	98
34								99.72	2.81	11.19	87.16	1.65	60.64	98.43	94.06	-1.75	-7.52	99	101
78		0.5					0.1	99.18	2.87	11.44	86.88	1.68	59.22			-0.82	-4.41		94
79		1.0					0.1	99.25	2.66	11.52	86.57	1.91	60.16			-2.08	-4.09		92
80				0.5			0.1	99.35	2.28	11.68	86.69	1.63	63.11			-2.14	-4.44		92
81				1.0			0.1	99.41	1.87	11.97	86.81	1.22	62.59	98.13	94.54	-2.62	-4.14	99	93
82					0.5	0.1		99.64	2.44	11.44	86.76	1.80	63.00			-2.33	-4.16		93
83		0.5			1.0	0.1		99.12	2.57	11.50	86.58	1.92	62.41			-2.57	-4.90		94
84		0.5			0.5	0.1		99.16	2.14	11.64	86.59	1.77	63.49			-2.60	-4.16		91
85		27	0.5					99.26	5.49	11.63	86.74	1.63	61.18			-2.13	-3.37		94
86		27	1.0					99.61	1.88	11.80	86.59	1.61	60.66			-1.87	-2.11		96
87		27		0.5				99.34	2.91	11.68	86.44	1.88	60.49			-2.06	-2.18		92
88		27		1.0				99.55	2.60	11.91	86.58	1.51	61.27	98.04	94.10	-2.74	-2.95	97	88
89		27			0.5			99.16	2.58	11.11	86.93	1.96	61.08			-1.73	-1.99		89
90		27			1.0			99.20	2.78	11.54	86.97	1.49	62.54			-2.13	-2.60		90
91		27	0.5			0.5		99.44	2.43	11.67	86.77	1.56	60.20			-2.01	-2.06		93

* Изменение рассчитывали по формуле $\Delta = (\text{значение после стресса} - \text{значение до стресса})$

** Абсолютное изменение рассчитывали по формуле

$$\Delta = |\text{содержание кисл. фракций до стресса} - \text{содержание кисл. фракций после стресса}| + |\text{содержание щел. фракций до стресса} - \text{содержание щел. фракций после стресса}| + |\text{содержание доминир. фракции до стресса} - \text{содержание доминир. фракции после стресса}|$$
 положительные результаты
 отрицательные результаты
 средние результаты / исходные данные

Общие выводы.

1. Скрининг стабильной фармацевтической композиции адалимумаба был выполнен в несколько этапов: выбор природы буферного раствора, выбор рН и буферной емкости раствора, выбор осмолитиков и стабилизаторов, выбор финальной фармацевтической композиции и подтверждение финальной фармацевтической композиции высококонцентрированного адалимумаба.

2. В процессе работы изучены термическая и коллоидная стабильность адалимумаба в более чем 90 составах с использованием следующих методов: ПЭГ-агрегация, шейк-тест, заморозка-разморозка, термостресс с последующим анализом степени мутности (УФ-спектрофотометрия), чистоты (эксклюзивная ВЭЖХ, динамическое светорассеяние и гель-электрофорез, в том числе с помощью системы Lab-Chip, Caliper), а также кислотно-щелочного профиля (LabChip, Caliper и ионообменная ВЭЖХ).

3. В результате исследования выявлена низкая термическая стабильность оригинального состава препарата Хумира (Хумира 1), используемого в коммерческом препарате с концентрацией адалимумаба 50 мг/мл, по сравнению с составами настоящего изобретения.

4. В ходе эксперимента выявлено значимое влияние процессов замораживания и оттаивания на агрегацию адалимумаба в оригинальном составе препарата Хумира (Хумира 2), используемом в коммерческом препарате адалимумаба 100 мг/мл, по сравнению с составами настоящего изобретения.

5. Фармацевтические композиции адалимумаба на основе ацетатного буферного раствора с pH 5.0-6.0 с добавлением трегалозы дигидрата, аргинина гидрохлорида, пролина, а также поверхностно-активных веществ из группы полисорбата 20, полисорбата 80 и полоксамера 188 проявляют большую термическую и коллоидную стабильность в концентрациях 50-150 мг/мл по сравнению оригинальными составами и являются предметом настоящего изобретения.

Оптимальный состав вспомогательных веществ адалимумаба выбран для растворов с pH 5.5. Стабильность адалимумаба в составах с диапазоном pH 5.0-6.0 подтверждена на образцах в концентрациях белка 50, 100 и 150 мг/мл.

6. В ходе технологического процесса при получении фармацевтических композиций настоящего изобретения с концентрацией адалимумаба 150 мг/мл концентрирование возможно до 200 мг/мл без потери качества белка для последующего разведения при внесении ПАВ, а также при промывке ультра-фильтрационной установки после концентрирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водная фармацевтическая композиция для внутривенного или подкожного введения, содержащая
 - a) адалимумаб в концентрации от 50 до 200 мг/мл;
 - b) натрий ацетат тригидрат в концентрации от 0.4 до 1.2 мг/мл;
 - c) трегалозу в концентрации от 25 до 150 мг/мл, и/или пролин в концентрации от 5 до 40 мг/мл, или трегалозу в концентрации 25 до 150 мг/мл и аргинин в концентрации от 0.05 до 0.5 мг/мл;
 - d) полисорбат 20 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл, полисорбат 80 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл или полоксамер 188 в концентрации от 0.05 до 10 мг/мл либо их комбинацию, где композиция имеет pH от 5 до 6.
2. Композиция по п.1, содержащая
 - a) от 50 до 200 мг/мл адалимумаба;
 - b) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.0-6.0;
 - e) от 0.1 до 1 мг/мл полисорбата 80.
3. Композиция по п.2, содержащая
 - a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 80.
4. Композиция по п.2, содержащая
 - a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 80.
5. Композиция по п.2, содержащая
 - a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 27 мг/мл пролина;
 - d) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - e) 0.5 мг/мл полисорбата 80.
6. Композиция по п.2, содержащая
 - a) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 - b) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 - c) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
 - d) 13.5 мг/мл пролина;
 - e) уксусную кислоту лед. до pH 5.5;
 - f) 0.5 мг/мл полисорбата 80.
7. Композиция по п.1, содержащая

- а) от 50 до 200 мг/мл адалимумаба;
 б) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или от 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0,05 до 0.5 мг/мл аргинина;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.0-6.0;
 е) от 0.1 до 1 мг/мл полисорбата 20.
8. Композиция по п.7, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
9. Композиция по п.7, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
10. Композиция по п.7, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 27 мг/мл пролина;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
11. Композиция по п.7, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
 д) 13.5 мг/мл пролина;
 е) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 ф) 0.5 мг/мл полисорбата 20.
12. Композиция по п.1, содержащая
 а) от 50 до 200 мг/мл адалимумаба;
 б) от 0.4 до 1.2 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) от 25 до 150 мг/мл трегалозы и/или 5 до 40 мг/мл пролина или от 25 до 150 мг/мл трегалозы и от 0.05 до 0.5 мг/мл аргинина;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.0-6.0;
 е) от 0.1 до 1 мг/мл полоксамера 188.
13. Композиция по п.12, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 80 мг/мл трегалозы дигидрата;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 1.0 мг/мл полоксамера 188.
14. Композиция по п.12, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 80 мг/мл трегалозы дигидрата и 0.1 мг/мл аргинина гидрохлорида;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 1.0 мг/мл полоксамера 188.
15. Композиция по п.12, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 27 мг/мл пролина;
 д) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;
 е) 1.0 мг/мл полоксамера 188.
16. Композиция по п.12, содержащая
 а) от 50 до 150 мг/мл адалимумаба;
 б) 0.436 мг/мл натрия ацетата тригидрата;
 в) 40 мг/мл трегалозы дигидрата;
 д) 13.5 мг/мл пролина;
 е) уксусную кислоту лед. до рН 5.5;

f) 1.0 мг/мл полоксамера 188.

17. Способ лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , включающий введения композиции по любому из пп.1-16 в эффективном количестве, где заболевание, опосредованное ФНО α , выбирают из группы

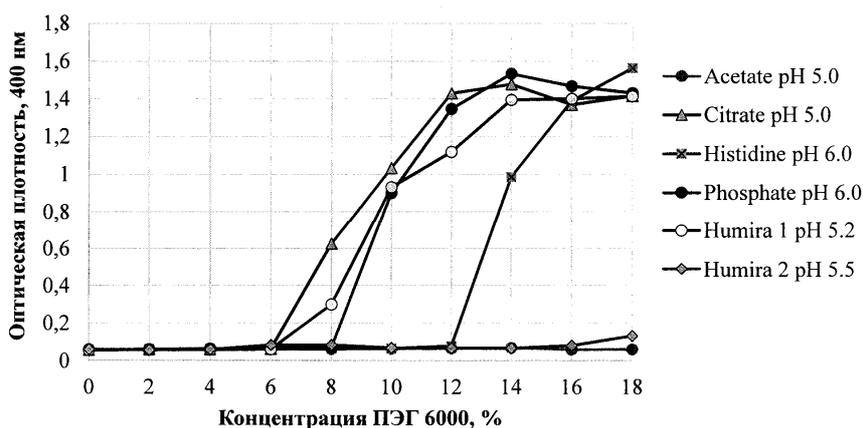
- a) среднетяжелой и тяжелой степени активный ревматоидный артрит;
- b) активный псориаз;
- c) активный анкилозирующий спондилит;
- d) среднетяжелой или тяжелой степени хронический бляшечный псориаз;
- e) среднетяжелой или тяжелой степени язвенный колит;
- f) аксиальный спондилоартрит;
- g) активный гнойный гидраденит;
- h) ювенильный идиопатический артрит;
- i) среднетяжелой или тяжелой степени болезнь Крона;
- j) увеит;
- k) активный энтезит-ассоциированный артрит.

18. Применение композиции по любому из пп.1-16 для лечения заболеваний, опосредованных ФНО α , где заболевание выбирают из группы

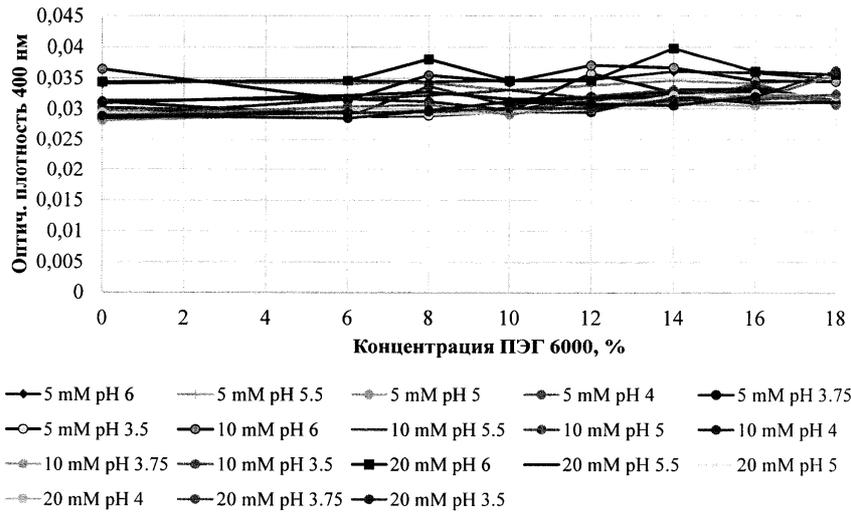
- a) среднетяжелой и тяжелой степени активный ревматоидный артрит;
- b) активный псориаз;
- c) активный анкилозирующий спондилит;
- d) среднетяжелой или тяжелой степени хронический бляшечный псориаз;
- e) среднетяжелой или тяжелой степени язвенный колит;
- f) аксиальный спондилоартрит;
- g) активный гнойный гидраденит;
- h) ювенильный идиопатический артрит;
- i) среднетяжелой или тяжелой степени болезнь Крона;
- j) увеит;
- k) активный энтезит-ассоциированный артрит.

19. Способ получения композиции по любому из пп.1-16, включающий добавление в водную фазу ацетатных буферных агентов с последующим добавлением в любой последовательности следующих компонентов:

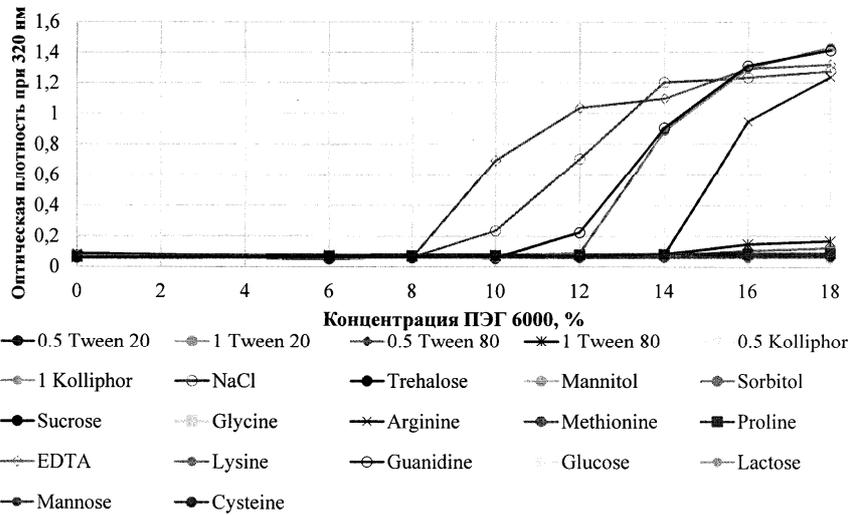
- a) осмолитика и/или стабилизатора, выбранного из группы трегалозы, пролина, аргинина или их сочетания;
- b) адалимумаба;
- c) поверхностно-активного вещества, выбранного из группы полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или их сочетания.



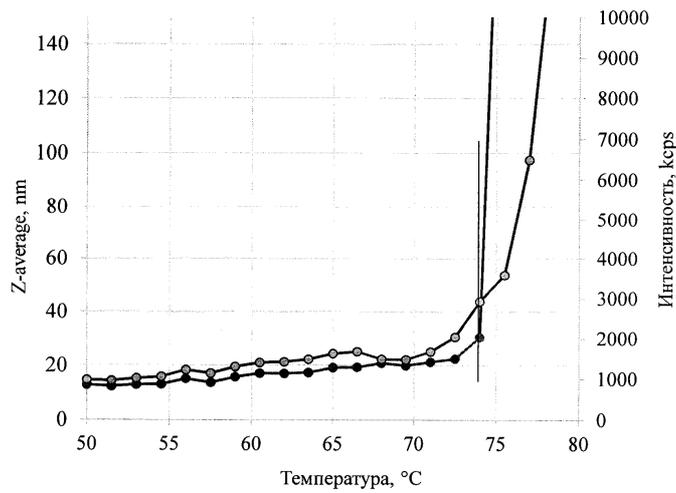
Фиг. 1



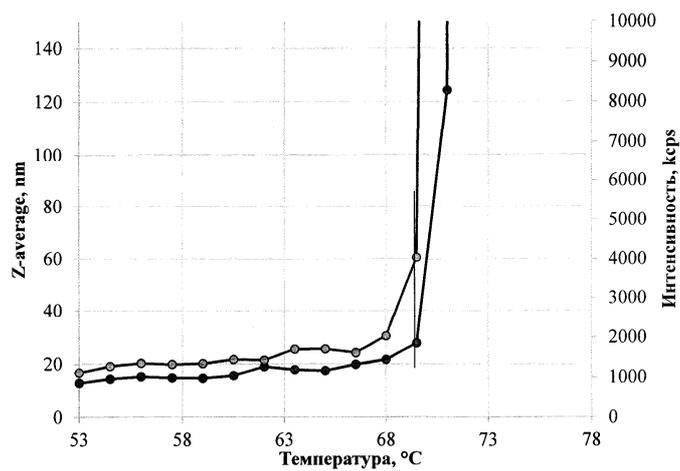
Фиг. 2



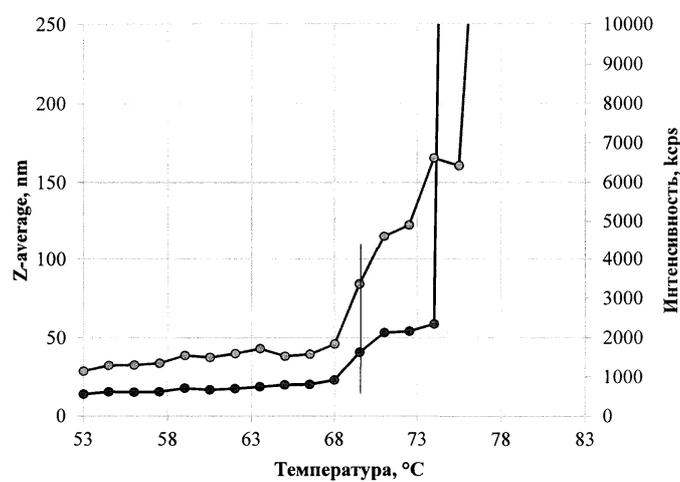
Фиг. 3



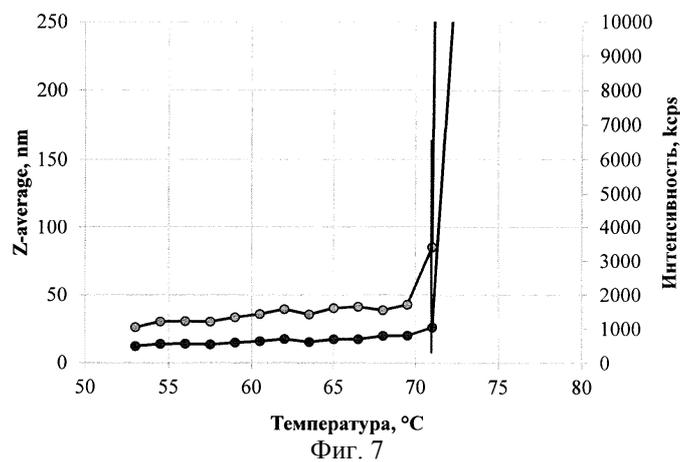
Фиг. 4



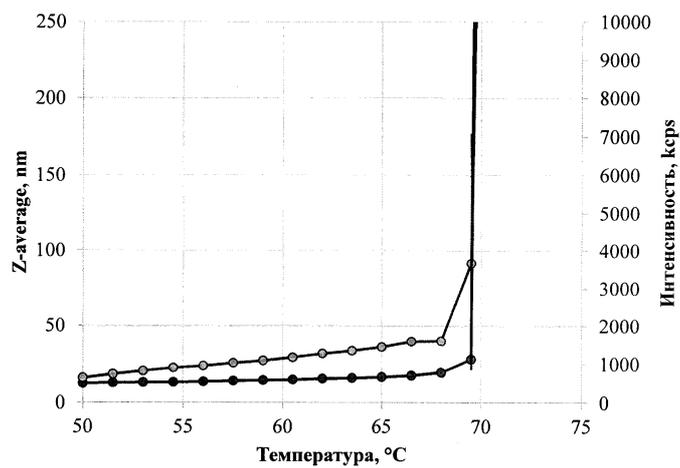
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

