

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042954**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.07

(21) Номер заявки
201591278

(22) Дата подачи заявки
2014.03.17

(51) Int. Cl. **A61K 38/00** (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ C1-INH, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ, ИНГИБИРОВАНИЯ ИЛИ ПРОФИЛАКТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОГО
АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА**

(31) **61/791,399**

(32) **2013.03.15**

(33) **US**

(43) **2016.03.31**

(86) **PCT/US2014/030309**

(87) **WO 2014/145519 2014.09.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВИРОФАРМА БАЙОЛОДЖИКС ЛЛС
(US)**

(72) Изобретатель:
**Галлахер Синтия, Радди Стивен,
Мэннинг Марк Корнелл (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A-6090777**
Schreiber, et al. Inhibition by CaINH of
Hageman Factor Fragment Activation of Coagulation,
Fibrinolysis, and Kinin Generation. J Clin Invest.
1973, 52(6):1402-1409; pg 1404, Fig 2, 3 and their
legends; pg 1405, col 1

(57) Раскрыта композиция, содержащая C1-INH, и ее применение для лечения, ингибирования или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО).

042954 B1

042954 B1

Данная заявка испрашивает, в соответствии с Разделом 35, §119(e), Свода Законов США, приоритет предварительной заявки на патент США № 61/791399, поданной 15 марта 2013 года. Вышеуказанная заявка включена здесь путем ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области терапевтических агентов и способов их применения. В частности, в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая C1-INH, и ее применение для лечения, ингибирования или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО).

Предшествующий уровень техники

Несколько публикаций и патентов процитированы в настоящем описании изобретения для того, чтобы описать состояние области техники, к которой относится данное изобретение. Полные цитаты этих ссылок могут быть найдены в данном описании изобретения. Каждая из этих цитат включена здесь путем ссылки во всей полноте.

Наследственный ангионевротический отек (НАО) представляет собой редкое опасное для жизни генетическое расстройство, вызванное дефицитом ингибитора C1 эстеразы (общую информацию см. на www.haei.org и www.haea.org). По меньшей мере 6500 человек в Соединенных Штатах Америки и по меньшей мере 10000 человек в Европе страдают от НАО. Пациенты, страдающие от НАО, испытывают рекуррентные, непредсказуемые, изнурительные, опасные для жизни приступы воспаления и субмукозного/подкожного отека. Воспаление, как правило, поражает гортань, живот, лицо, конечности и мочеполовой тракт. Это генетическое расстройство представляет собой результат дефекта в гене, управляющем синтезом ингибитора C1 эстеразы. Соответственно, восстановление уровней активного ингибитора C1 эстеразы у этих пациентов до нормальных или близких к нормальным представляет собой эффективную меру при лечении НАО. Тем не менее, желательны новые и улучшенные способы лечения и профилактики расстройств, ассоциированных с дефицитом ингибитора C1 эстеразы, таких как НАО.

Краткое изложение сущности изобретения

В соответствии с настоящим изобретением предложена композиция для ингибирования, лечения и/или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО) у субъекта. В конкретном воплощении композиция содержит от 400 ЕД/мл до 600 ЕД/мл ингибитора C1 эстеразы, цитратный буфер или фосфатный буфер, при этом рН указанной композиции составляет от 6,5 до 8,0, и при этом указанная композиция представляет собой композицию для подкожного введения. Также здесь предложено применение композиции согласно изобретению для лечения, ингибирования или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена аминокислотная последовательность человеческого ингибитора C1 эстеразы.

На фиг. 2 представлен график эффекта концентрации белка в отношении вязкости для образцов, концентрированных путем первоначального центрифугирования.

Подробное описание изобретения

Восстановление уровней активных ингибиторов C1 эстеразы у пациентов, страдающих от расстройства, ассоциированного с недостаточными или сниженными уровнями активного ингибитора C1 эстеразы (например, НАО), представляет собой эффективную меру при лечении таких расстройств. В настоящее время ингибитор C1 эстеразы (такой как Cinryze® (ViroPharma, Inc.; Exton, PA)) внутривенно вводится пациенту медицинскими работниками. В настоящем изобретении предложены композиции ингибитора C1 эстеразы (такого как Cinryze®), которые также эффективны при подкожном (ПК) введении. Неожиданно, подкожное введение ингибитора C1 эстеразы оказалось достаточным для поддержания уровней ингибитора C1 эстеразы в крови. ПК введение ингибитора C1 эстеразы удовлетворяет ранее не удовлетворенную потребность, которая существовала в медицине вследствие ограничений, связанных с внутривенным введением, у пациентов, страдающих от НАО.

В соответствии с настоящим изобретением предложена композиция для лечения, ингибирования и/или профилактики наследственного ангионевротического отека у субъекта.

Ингибиторы C1 эстеразы также известны как ингибиторы C1 (C1-INH). Ингибиторы C1 эстеразы представляют собой ингибиторы комплемента C1 и относятся к суперсемейству ингибиторов сериновых протеаз. Человеческий ингибитор C1 эстеразы представляет собой белок из 500 аминокислот, включающий сигнальную последовательность из 22 аминокислот (Carter et al. (1988) Eur. J. Biochem., 173:163). В плазме крови ингибитор C1 эстеразы представлен в виде в значительной степени гликозилированного гликопротеина массой приблизительно 76 кДа (Perkins et al. (1990) J. Mol. Biol., 214:751). Активность ингибитора C1-эстеразы может быть проанализирована при помощи известных способов (см., например, Drouet et al. (1988) Clin. Chim. Acta., 174:121-30). В конкретном воплощении ингибитор C1 эстеразы является человеческим. Аминокислотная последовательность человеческого ингибитора C1 эстеразы представлена в GenBank и имеет каталожный номер CAA30314 (см. также GeneID: 710, где также представлены нуклеотидные последовательности ингибитора C1 эстеразы), и приведена на фиг. 1. Ингибитор C1 эстеразы для применения в способах по настоящему изобретению может иметь аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, определенной в SEQ ID NO: 1.

кислотной последовательности на фиг. 1. Ингибитор С1 эстеразы может быть выделен или очищен из плазмы крови (например, человеческой плазмы крови) или продуцирован рекомбинантным способом. В случае очистки из плазмы крови ингибитор С1 эстеразы может быть подвергнут нанофильтрации и пастеризован. В конкретном воплощении полученный из плазмы крови ингибитор С1 эстеразы представляет собой Cinryze®. В конкретном воплощении ингибитор С1 эстеразы присутствует в композициях по настоящему изобретению в высокой концентрации. Действительно, было установлено, что композиции, содержащие очень высокие уровни ингибитора С1 эстеразы, являются неожиданно устойчивыми и активными. В конкретном воплощении ингибитор С1 эстеразы присутствует в концентрации от 400 ЕД/мл до 600 ЕД/мл, или приблизительно 500 ЕД/мл.

В конкретном воплощении композиции по настоящему изобретению не содержат цитрат или лимонную кислоту. Композиции, не содержащие цитрата и лимонной кислоты, особенно полезны для подкожного введения ингибитора С1 эстеразы, поскольку цитрат или лимонная кислота могут вызвать реакцию в месте инъекции. В конкретном воплощении буфер в композициях в соответствии с настоящим изобретением представляет собой фосфат натрия (например, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ фосфата натрия, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ фосфата натрия, или приблизительно 20 мМ фосфата натрия). В конкретном воплощении (например, для внутривенного введения) буфер в композициях в соответствии с настоящим изобретением содержит карбоксильную группу. Например, буфер может без ограничения представлять собой цитрат, сукцинат, тартрат, малеат, ацетат и их соли. В конкретном воплощении буфер в композициях согласно настоящему изобретению представляет собой цитрат или цитрат натрия (например, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ цитрата натрия, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 30 мМ цитрата натрия или приблизительно 20 мМ цитрата натрия).

Композиции согласно настоящему изобретению могут иметь диапазон рН от 6,5 до 8,0, в частности, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5, и, в частности, от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,0.

Композиции согласно настоящему изобретению также могут содержать полисорбат 80 (TWEEN). Композиции, содержащие полисорбат 80, особенно полезны, поскольку они уменьшают/ограничивают агрегацию белка. Полисорбат 80 также может ограничивать белковые взаимодействия, когда композицию приводят в контакт с содержащими силикон смазывающими веществами/маслами, такими как смазывающие вещества/масла, используемые в шприцах и других устройствах для введения. Композиции, содержащие полисорбат 80, также полезны для лиофилизированных препаратов. В конкретном воплощении полисорбат 80 присутствует в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1%, в частности, от приблизительно 0,025% до приблизительно 0,075%, в частности, приблизительно 0,05%.

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать сахарозу. Сахароза может быть добавлена в качестве агента-"наполнителя", а также защитного агента при лиофилизации. В конкретном воплощении сахарозу добавляют к композициям, которые подлежат лиофилизации. В конкретном воплощении композиции содержат от приблизительно 25 мМ до приблизительно 125 мМ сахарозы, в частности от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ сахарозы.

Композиции по настоящему изобретению могут также содержать по меньшей мере одну аминокислоту или ее соль, в частности, метионин и/или аргинин. Аргинин, несущий положительный заряд на своей боковой цепи, может быть использован для забуферивания растворов с фосфатом. Метионин действует в качестве стабилизатора (например, ограничивая окисление). Аминокислоты могут присутствовать в композиции в виде отдельных аминокислот или в виде коротких пептидов (например, от 2 до приблизительно 5 аминокислот, в частности, дипептидов или трипептидов).

Как указано выше, настоящее изобретение охватывает применение для лечения, ингибирования и/или профилактики наследственного ангионевротического отека. Как указано выше, НАО представляет собой опасное для жизни и тяжело протекающее заболевание, которое проявляется как рецидивирующие приступы субмукозного/подкожного опухания вследствие дефицита ингибитора С1 эстеразы (Zuraw, B.L. (2008) *N. Engl. J. Med.*, 359: 1027-1036). В конкретном воплощении наследственный ангионевротический отек представляет собой отек I или II типа.

Как тип I, так и тип II связан с дефектом гена, отвечающего за синтез ингибитора С1 эстеразы, вследствие чего ингибитор С1 не продуцируется (НАО тип I) или продуцируется нефункциональный ингибитор С1 (НАО тип II) (Rosen et al. (1965) *Science* 148: 957-958; Bissler et al. (1997) *Proc. Assoc. Am. Physicians* 109: 164-173; Zuraw et al. (2000) *J. Allergy Clin. Immunol.* 105: 541-546; Bowen et al. (2001) *Clin. Immunol.* 98: 157-163).

Настоящим изобретением охвачены композиции, содержащие по меньшей мере один ингибитор С1 эстеразы и цитратный буфер или фосфатный буфер. Такие композиции могут быть введены в терапевтически эффективном количестве пациенту, нуждающемуся в таком введении, для лечения расстройства, ассоциированного с дефицитом ингибитора С1 эстеразы.

Агенты и композиции по настоящему изобретению могут быть введены при помощи любого подходящего пути, например путем инъекции (например, для локального (прямого) или системного введения). В конкретном воплощении композицию вводят подкожно или внутривенно. Как правило, фармацевтически приемлемый носитель в композиции выбран из группы разбавителей, консервантов, солиоби-

лизаторов, эмульгаторов, адьювантов и/или носителей. Композиции могут включать разбавители с различными буферным содержимым (например Tris HCl, ацетат, фосфат), рН и ионной силой, и добавки, такие как детергенты и солюбилизующие агенты (например, Tween 80, полисорбат 80), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт) и наполнители (например лактоза, маннит). Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена, например, в жидкой форме, или может быть представлена в высушенной порошкообразной форме (например лиофилизированной для последующего разведения).

В конкретном воплощении композиции готовят в лиофилизированной форме. Когда композиции представлены в лиофилизированной форме, их разводят перед применением (например, в течение одного часа, нескольких часов или за день или более до применения) при помощи подходящего буфера (например, стерильной воды, стерильного физиологического раствора или стерильного раствора, содержащего подходящие фармацевтически приемлемые носители (например, для разведения вышеописанных композиций). Буфер(ы) для разведения может(гут) присутствовать в наборах по настоящему изобретению или может(гут) быть получен(ы) или поставляться отдельно.

Используемый здесь термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, диспергирующие среды и т.п., которые могут подходить для желаемого пути введения фармацевтического препарата, примеры которых приведены в предыдущем абзаце. Применение таких сред для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. Может рассматриваться применение в фармацевтическом препарате любых обычных сред или агентов при условии, что они не являются несовместимыми с вводимыми молекулами.

Выбор подходящего фармацевтического препарата зависит от выбранного способа введения. В данном случае фармацевтический препарат содержит молекулы, диспергированные в среде, совместимой с тканью, в которую их вводят. Способы приготовления композиций для парентерального или подкожного введения хорошо известны в данной области техники (см., например Remington's Pharmaceutical Science (E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA)).

Как указано выше, агенты по настоящему изобретению вводят парентерально - например при помощи внутривенной инъекции в кровяной поток, и/или при помощи подкожной инъекции. Фармацевтические препараты для парентеральной, внутривенной и подкожной инъекции известны в данной области техники. Если в качестве способа введения молекул выбрана парентеральная инъекция, должны быть осуществлены шаги, требуемые для обеспечения того, чтобы достаточное для реализации биологического эффекта количество молекул достигало клеток-мишеней.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента в тесной смеси с фармацевтическим носителем, могут быть приготовлены в соответствии с обычными способами приготовления фармацевтических смесей. Носитель может быть представлен в большом разнообразии форм в зависимости от формы препарата, желаемой для введения, например парентерального или подкожного. В случае препаратов для парентерального введения носитель обычно содержит стерильную воду, хотя могут быть включены другие ингредиенты, например способствующие задачам растворимости или задачам консервирования. Также могут быть приготовлены инъекционные суспензии, в которых могут быть использованы подходящие жидкие носители, суспендирующие агенты и т.п.

Фармацевтический препарат по изобретению может быть приготовлен в виде стандартной лекарственной формы для легкости введения и однородности дозы. Понятие "стандартная лекарственная форма", как оно используется здесь, относится к физически дискретной единице фармацевтического препарата, приемлемой для пациента, подвергаемого лечению. Каждая доза должна содержать количество активного ингредиента, рассчитанное для достижения желаемого действия, в ассоциации с выбранным фармацевтическим носителем. Стандартные дозы могут быть пропорционально увеличены или уменьшены, исходя из массы пациента. Подходящие концентрации для облегчения конкретного патологического состояния могут быть определены при помощи расчетов с использованием кривой зависимости концентрации от дозы. Подходящие стандартные дозы также могут быть определены путем оценки эффективности лечения.

Фармацевтический препарат, содержащий молекулы по настоящему изобретению, может быть введен через подходящие интервалы времени, например, ежедневно, через сутки, каждые трое суток, пять суток из каждых семи суток, или по меньшей мере один, два или три раза в неделю или больше до облегчения или ослабления интенсивности патологических симптомов, после чего доза может быть уменьшена до поддерживающего уровня. Подходящий интервал в конкретном случае обычно может зависеть от состояния пациента.

В конкретном воплощении, ингибитор С1 эстеразы присутствует в композиции или его вводят в диапазоне от приблизительно 100 единиц до приблизительно 10000 единиц; от приблизительно 500 единиц до приблизительно 5000 единиц; от приблизительно 1000 единиц до приблизительно 3500 единиц, или от приблизительно 1500 единиц до приблизительно 2500 единиц. В конкретном воплощении используют по меньшей мере приблизительно 2000 единиц. В конкретном воплощении используют высокую первоначальную дозу ингибитора С1 эстеразы (как перечислено выше (может быть введена внутривен-

но)), а затем меньшие поддерживающие дозы. Например, высокая первоначальная доза может быть по меньшей мере в 1,5; 2; 3; 4 или 5 раз выше последующих доз. В конкретном воплощении ингибитор С1 эстеразы присутствует в поддерживающей композиции, или его вводят для поддержания, в диапазоне от приблизительно 100 единиц до приблизительно 5000 единиц; от приблизительно 250 единиц до приблизительно 2000 единиц; от приблизительно 250 единиц до приблизительно 1000 единиц; или приблизительно 500 единиц. В способах согласно настоящему изобретению возможны высокие первоначальные дозы ингибитора С1 эстеразы (например, они могут быть возможны в профилактических способах).

В конкретном воплощении ингибитор С1 эстеразы вводят с такой частотой и дозой, чтобы увеличить уровень ингибитора С1 эстеразы до по меньшей мере приблизительно 0,3 или, в частности, 0,4 ЕД/мл или даже до приблизительно 1 ЕД/мл (1 ЕД/мл представляет собой среднее количество ингибитора С1, присутствующее в 1 мл нормальной человеческой плазмы крови) в крови субъекта. Например уровень ингибитора С1 эстеразы может поддерживаться на уровне 0,4 ЕД/мл или выше в течение по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или большего промежутка времени или всего периода времени (например периода времени, в течение которого вводят лекарство). Например, введение первоначальной дозы ингибитора С1 эстеразы 2000 ЕД, а затем 250 ЕД каждые сутки или 500 ЕД через сутки приводит в результате к поддержанию уровня в крови чуть ниже 0,4 ЕД/мл. Кроме того, введение первоначальной дозы ингибитора С1 эстеразы 2000 ЕД, а затем 1000 ЕД каждые 3 суток приводит в результате к поддержанию уровня в крови приблизительно 0,4 ЕД/мл. В частности, для облегчения применения пациентом могут быть предпочтительны менее частые введения. Введение первоначальной дозы ингибитора С1 эстеразы 2000 ЕД, а затем 500 ЕД каждые сутки при том, что в выходные введение не осуществляют, (т.е. 5 из 7 суток) также приводит в результате к поддержанию в крови уровня приблизительно 0,4 ЕД/мл или более высокого уровня. Примечательно, что введение только поддерживающих доз приводит в результате к достижению увеличенных и физиологически релевантных уровней ингибитора С1 эстеразы в крови, которое однако отложено по времени по сравнению с теми случаями, когда вводят высокую первоначальную дозу.

Определения

Если явно не указано иное, то существительные в единственном числе включают множественные объекты.

Используемый здесь термин "приблизительно" может относиться к $\pm 5\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$.

Используемые здесь термины "хозяин", "субъект" и "пациент" относятся к любому животному, включая человека.

Используемый здесь термин "предупреждать" относится к профилактическому лечению субъекта, имеющему риск развития состояния (например, НАО или приступ НАО), приводящему в результате к уменьшению вероятности того, что у субъекта разовьется состояние.

Используемый здесь термин "лечить" относится к любому типу лечения, которое приносит пользу пациенту, страдающему от расстройства, включающую улучшение состояния пациента (например, одного или более чем одного симптома), задержку прогресса состояния и т.п. В конкретном воплощении лечение НАО приводит по меньшей мере к уменьшению тяжести и/или количества приступов НАО.

Фраза "эффективное количество" относится к количеству терапевтического агента, которое приводит в результате к улучшению состояния пациента. "Терапевтически эффективное количество" соединения или фармацевтической композиции относится к количеству, эффективному для предупреждения, ингибирования, лечения или уменьшения симптомов конкретного расстройства или заболевания.

"Фармацевтически приемлемый" указывает на одобрение контролирующего органа федерального правительства или правительства штата или на указание в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для использования в отношении животных, и, в частности, людей.

"Носитель" относится, например, к разбавителю, адьюванту, консерванту (например тимеросалу, бензиловому спирту), антиоксиданту (например аскорбиновой кислоте, метабисульфиту натрия), солюбилизатору (например, TWEEN 80, полисорбату 80), эмульгатору, буферу (например Tris HCl, ацетату, фосфату), воде, водным растворам, маслам, наполнителю (например лактозе, манниту), крио-/лио-защитным агентам, регулятору тоничности, эксципиенту, вспомогательному агенту или разбавителю, с которым вводят активный агент по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтические носители описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, PA); Genaro, A. R., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (Lippincott, Williams and Wilkins); Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y.; и Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington.

Термин "выделенный" может относиться к белку, нуклеиновой кислоте, соединению или клетке, которая достаточно отделена от окружающей среды, с которой она в природе может быть ассоциирована (например, так, что она представлена в "по существу чистой" форме). "Выделенный" не обязательно обозначает исключение искусственных или синтетических смесей с другими соединениями или материалами, или присутствие примесей, которые не влияют на фундаментальную активность, и которые могут присутствовать, например, вследствие неполной очистки.

Термин "по существу чистый" относится к препарату, содержащему по меньшей мере 50-60 мас.%,

данного материала (например нуклеиновой кислоты, олигонуклеотида, белка и т.п.). В некоторых воплощениях препарат содержит по меньшей мере 75 мас.%, в частности 90-95% или больше по массе данного соединения. Чистоту измеряют при помощи способов, подходящих для данного соединения (например, хроматографических способов, электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, анализа при помощи ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и т.п.).

Следующий пример предложен для иллюстрации различных воплощений настоящего изобретения. Пример является иллюстративным и не предполагается, что он каким-либо образом ограничивает изобретение.

Пример

Исследования на центрифужном концентраторе

Белок наносили на центрифужные концентраторы и центрифугировали при 10500 об./мин в течение от 5 до 10 минут. После остановки центрифугирования образцов регистрировали конечные объемы в центрифужных концентраторах и рассчитывали приблизительную концентрацию белка. В центрифужные концентраторы добавляли дополнительное количество белка и проводили центрифугирование до достижения желаемой концентрации белка, в момент которого осуществляли УФ-измерение. Для каждой концентрации белка осуществляли УФ-измерение и измерение вязкости. Вышеописанную процедуру продолжали до тех пор, пока вязкость белка не начинала предотвращать дальнейшее концентрирование образца.

Измерения вязкости

Вязкость определяли путем измерения времени, которое требуется образцу для того, чтобы пройти predetermined расстояние в геле, заполняющем наконечник для пипетки. Для расчета вязкости образца сначала строили стандартную кривую с использованием набора стандартов, обладающих известными вязкостями. Для построения такой кривой подходят растворы сахарозы (или Брик), но также должен подходить любой материал, имеющий известную вязкость при определенной температуре.

Для осуществления измерений сжимают плунжер пипетки, наконечник пипетки погружают во флакон с образцом, плунжер отпускают, и время, которое потребуется жидкости для прохождения predetermined расстояния в наконечнике пипетки, измеряли при помощи секундомера. Расстояние, используемое для этих экспериментов, составляло 30 мкл воды. Важно отметить, что наконечник пипетки пригоден только для единичного эксперимента, вследствие чего для проведения параллельных исследований образца используют несколько наконечников. Кроме того, объем, засасываемый в наконечник пипетки, должен быть больше, чем объем, маркированный на наконечнике, для обеспечения однородного засасывания образца во время измерения. В случае, когда маркировка объема на наконечнике для пипетки составляла 30 мкл, микропипетка была настроена так, чтобы засасывать 42 мкл.

Результаты

В настоящем примере установлено, что можно получать более высокую концентрацию жидкой композиции C1-INH в виде монокомпозиции. Первоначальные исследования были сфокусированы на концентрировании маточного раствора C1-INH с использованием способа центрифужного концентрирования. Первоначально производили корректировку pH растворов, но никакой другой эксципиент не добавляли. Исследовали три значения pH (pH 5,9, 6,9 и 7,9). При центрифужном концентрировании все растворы оставались прозрачными до концентраций приблизительно 500 ЕД/мл (приблизительно 100 мг/мл) при всех протестированных значениях pH (табл. 1). Хотя в этих исследованиях не был достигнут предел растворения, были обнаружены измеримые увеличения вязкости при концентрациях, превышающих 300 ЕД/мл (фиг. 2). При всех значениях pH вязкость начинает заметно увеличиваться, когда концентрация C1-INH превосходит 400 ЕД/мл.

7,9		6,9		5,9	
ЕД/мл	вязкость	ЕД/мл	вязкость	ЕД/мл	вязкость
93,12	0,99	182,4	4,23	187,2	2,36
415,18	3,95	289,4	4,90	296,9	7,71
454,81	13,74	378,6	12,08	396,7	5,46
501,17	30,43	479,0	14,67	478,8	24,09

Табл. 1: конечные концентрации (в ЕД/мл) и вязкости образцов, приготовленных в экспериментах центрифужного концентрирования. Эти значения основаны на первоначальной концентрации первоначальной партии лекарства 160 ЕД/мл.

Было проведено более крупное исследование возможности технической реализации, в котором исследовали различные буферы (20 мМ фосфат, 20 мМ цитрат и 20 мМ Tris) при каждом из трех целевых значений pH. Готовили образцы 400 ЕД/мл и 500 ЕД/мл и оценивали в отношении стабильности после одной недели при 40°C и после двух недель при 25°C. Первоначальные уровни вязкости превосходили значения для чистой воды (~1 мПа·с), но находились в пределах, обычно устанавливаемых для применения в качестве инъектируемого продукта (табл. 2). Значения вязкости для образцов 400 ЕД/мл были меньше, чем при 500 ЕД/мл, обычно на 7-10 мПа·с. При хранении при 40°C в течение одной недели вяз-

кость всех образцов увеличивалась. При pH 5,9 все образцы превращались в гель, вероятно вследствие термически вызванной агрегации. У оставшихся композиций вязкость до некоторой степени увеличивалась. В некоторых случаях эти значения превосходили 30 мПа·с. Увеличение вязкости было меньше при хранении при 25°C чем при 40°C. Происходило лишь небольшое, если вообще происходило, изменение в случае образцов с pH 6,9, что указывает на то, что значение pH 6,9 может быть более благоприятно точки зрения стабильности при длительном хранении.

pH	[C1 INH]	Буфер	t0	t1	t2
5,9	400	фосфатный	13,3±0,6	гель	17,4±2,1
	500		24,6±1,5	гель	36,9±7,3
	400	гистидин	14,7±0,8	гель	19,1±2,5
	500		27,7±3,8	гель	27,7±3,8
6,9	400	фосфатный	12,2±1,5	16,1±0,6	11,9±3,0
	500		20,8±2,0	35,3±2,1	32,1±7,7
	400	цитратный	7,4±0,8	9,2±0,7	7,1±0,6
	500		14,4±3,2	19,8±1,1	12,6±0,5
7,9	400	фосфатный	8,2±1,2	12,8±0,7	22,0±3,5
	500		16,2±1,4	23,1±2,1	25,5±7,5
	400	tris	14,1±0,7	18,7±0,7	30,0±3,8
	500		20,5±0,9	33,3±6,2	31,0±1,8

Табл. 2: вязкость в момент t0 и после одной недели хранения при 40°C (t1). Вязкость выражена в мПа·с.

Примечательно, что при pH 6,9 цитратные композиции обладают меньшими значениями вязкости, чем фосфатные, хотя при pH 7,9 фосфатный буфер обеспечивал меньшую вязкость, чем буфер tris. Более высокая вязкость подразумевает, что для доставки определенного объема лекарства в пределах определенных временных рамок потребуется большая сила.

Чистота согласно данным обращено-фазовой ВЭЖХ исходно составляла около 86-87% для композиций при pH 6,9 и выше (табл. 3). Первоначальные уровни были меньше при pH 5,9, что свидетельствует о том, что некоторая степень деградации уже произошла в процессе приготовления образцов. При хранении в течение одной недели при 40°C образцы с pH 5,9 превращались в гель, что приводило к тому, что анализ при помощи обращено-фазовой ВЭЖХ становился невозможным. Для всех других образцов процентная чистота по существу не менялась, что свидетельствует о том, что при хранении в этих условиях химическая деградация будет незначительной, если вообще будет происходить.

pH	[C1 INH]	Буфер	t0	t1	t2
5,9	400	фосфатный	82,87±0,75	гель	81,10±2,11
	500		84,74±1,24	гель	83,61±1,02
	400	гистидин	84,11±1,53	гель	85,34±1,55
	500		86,36±0,76	гель	82,99±0,64
6,9	400	фосфатный	87,14±0,67	88,59±0,29	85,19±2,00
	500		86,44±1,49	85,65±1,32	84,07±1,24
	400	цитратный	86,67±1,36	82,92±1,48	86,03±0,87
	500		86,89±1,24	86,74±0,88	84,42±1,19
7,9	400	фосфатный	86,09±1,14	85,29±0,84	85,98±0,90
	500		86,47±1,15	83,57±1,33	84,00±0,97
	400	tris	87,14±0,98	81,74±7,89	86,14±0,81
	500		88,74±0,82	87,24±1,47	87,30±0,95

Табл. 3: процентная чистота в соответствии с данными обращено-фазовой ВЭЖХ при хранении при 25°C (t2) или 40°C (t1).

В случае образцов, которые хранили в течение двух недель при 25°C, имелись небольшие потери по сравнению с теми, которые наблюдались в момент t1. Взятые вместе, данные обращено-фазовой ВЭЖХ указывают на то, что имеют место небольшие потери вследствие химической деградации. Более высокое значение pH, по-видимому, приводит к уменьшению скорости деградации, и может иметь место некоторая чувствительность к композиции буфера.

Хотя химическая стабильность C1-INH, по-видимому, не изменяется при хранении, имеет место не-

которая физическая нестабильность, обнаруживаемая по данным гель-проникающей хроматографии (табл. 4). В смеси С1-INH также присутствуют другие белки, вследствие чего общая 'чистота' в момент t_0 составляет приблизительно 67%. При хранении при 40°C в течение одной недели (t_1) общее содержание мономеров в образцах уменьшается до 54-56% для образцов с рН 6,9 и выше. Между двумя различными условиями рН, различными буферами и двумя концентрациями белка различие было небольшим. При хранении в течение двух недель при 25°C (t_2) при рН 5,9 образцы не превращались в гель, как при более высокой температуре хранения. Тем не менее, обнаружена заметно более высокая деградация, особенно с гистидиновым буфером. Для этих случаев при рН 6,9 или 7,9 потеря, измеренная при помощи гель-проникающей хроматографии, составляла приблизительно 2% или около того, по сравнению с потерей 10-12% при более высокой температуре в течение половины времени.

рН	[С1 INH]	Буфер	t_0	t_1	t_2
5,9	400	фосфатный	68,32±1,04	гель	62,56±0,94
	500		67,19±0,14	гель	61,46±0,14
	400	гистидин	64,68±0,42	гель	46,58±1,09
	500		66,60±0,08	гель	44,48±1,04
6,9	400	фосфатный	67,85±0,22	55,29±0,36	
	500		67,41±0,36	54,79±0,14	65,45±0,23
	400	цитратный	67,82±0,07	56,14±0,41	65,49±0,16
	500		67,43±0,30	56,59±0,33	65,03±0,36
7,9	400	фосфатный	67,85±0,09	54,96±0,52	61,31±0,25
	500		67,58±0,40	55,57±0,56	64,98±0,50
	400	Tris	67,63±0,27	55,40±0,30	65,70±0,56
	500		67,67±0,47	56,18±0,64	66,19±0,84

Табл. 4: содержание мономеров в соответствии с данными гель-проникающей хроматографии при хранении при 25°C (t_2) или 40°C (t_1)

Данные указывают на то, что скорость деградации приблизительно в 13-35-раз меньше при 4°C, чем при 25°C. Более высокая оценка получена с использованием графика Аррениуса. Более низкая оценка получена в результате определения средней потери при уменьшении температуры на 5°C и экстраполяции для температуры хранения 4°C. С использованием этих данных в качестве показателя можно предсказать потерю приблизительно 3-10% за два года при температуре холодильного хранения. Другими словами, как следует из этих данных, жидкая композиция, по-видимому, весьма устойчива. Кроме того, скорость деградации образцов 400 и 500 ЕД/мл является приблизительно сопоставимой, что свидетельствует о том, что разработка композиции с более высокой концентрацией вполне осуществима.

Скорость деградации гораздо выше при рН 5,9, что приводит к превращению в гель при 40°C и большим потерям при 25°C. Таким образом, дальнейший отбор рН/буфера будет сфокусирован на диапазоне рН от 6,5 до 8,0. Существует ясный эффект буфера в отношении вязкости и возможно также стабильности.

Исследования продемонстрировали, что не существует предела растворения для приготовления С1-INH в концентрациях до 500 ЕД/мл. Имеет место увеличение вязкости после того, как концентрация достигает диапазона 400-500 ЕД/мл (зависит от буфера, причем цитрат лучше, чем фосфат, который в свою очередь лучше, чем Tris), но оно поддается управлению и все же дает возможность легкой доставки путем инъекции в случае стандартных шприцевых систем. Как правило, С1-INH относительно устойчив к химической деградации, что определяли при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Хотя выше специально описаны некоторые из предпочтительных воплощений настоящего изобретения с приведением примеров, не предполагается, что изобретение будет ограничено такими воплощениями. Различные модификации могут быть осуществлены без отступления от объема и сущности настоящего изобретения, которые изложены в следующей формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения, ингибирования или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО), содержащая от 400 до 600 ЕД/мл ингибитора С1 эстеразы, цитратный буфер или фосфатный буфер, при этом рН указанной композиции составляет от 6,5 до 8,0, где указанная композиция представляет собой композицию для подкожного введения.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный ингибитор С1 эстеразы присутствует в количестве от 400 до 500 ЕД/мл.

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, отличающаяся тем, что указанный ингибитор С1 эстеразы выделен или очищен из плазмы крови человека или получен рекомбинантным способом, и/или

указанный ингибитор С1 эстеразы имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности ингибитора С1 эстеразы человека, приведенной на фиг. 1.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит цитратный буфер, содержащий цитрат или цитрат натрия, возможно от 5 до 50 мМ цитрата натрия, от 10 до 30 мМ цитрата натрия, или 20 мМ цитрата натрия.

5. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что указанный фосфатный буфер содержит фосфат натрия, возможно от 5 до 50 мМ фосфата натрия, от 10 до 30 мМ фосфата натрия, или 20 мМ фосфата натрия.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит по меньшей мере одну аминокислоту или ее соль.

7. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что указанная композиция получена из лиофилизированной формы путем восстановления буфером перед введением.

8. Применение композиции по любому из пп.1-7 для лечения, ингибирования или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАО).

9. Применение по п.8, отличающееся тем, что указанный ингибитор С1 эстеразы вводят ежедневно, через сутки, каждые трое суток, один раз в неделю, два раза в неделю или три раза в неделю.

10. Применение по пп.8 или 9, отличающееся тем, что указанный ингибитор С1 эстеразы вводят субъекту в высокой первоначальной дозе, а затем вводят последующие меньшие поддерживающие дозы, при этом, необязательно, указанная высокая первоначальная доза по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4 или 5 раз выше последующих доз, и/или указанную высокую первоначальную дозу вводят внутривенно, а затем указанный ингибитор С1 эстеразы вводят подкожно.

11. Применение по любому из пп.8-10, отличающееся тем, что указанное введение ингибитора С1 эстеразы повышает уровни ингибитора С1 эстеразы в крови у субъекта, при этом уровни указанного ингибитора С1 эстеразы в крови повышаются до по меньшей мере 0,3 ЕД/мл, 0,4 ЕД/мл или до 1 ЕД/мл.

12. Применение по любому из пп.8-11, отличающееся тем, что указанные уровни ингибитора С1 эстеразы в крови остаются равными или превышающими 0,4 ЕД/мл в течение по меньшей мере 50%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% времени.

13. Применение по любому из пп.8-12, отличающееся тем, что:

(i) наследственный ангионевротический отек (НАО) представляет собой отек I или II типа;

(ii) введение указанного ингибитора С1 эстеразы обеспечивает профилактическое лечение НАО;

(iii) указанное лечение НАО обеспечивает по меньшей мере снижение тяжести и/или количества приступов НАО; или

(iv) введение указанного ингибитора С1 эстеразы обеспечивает лечение приступа НАО.

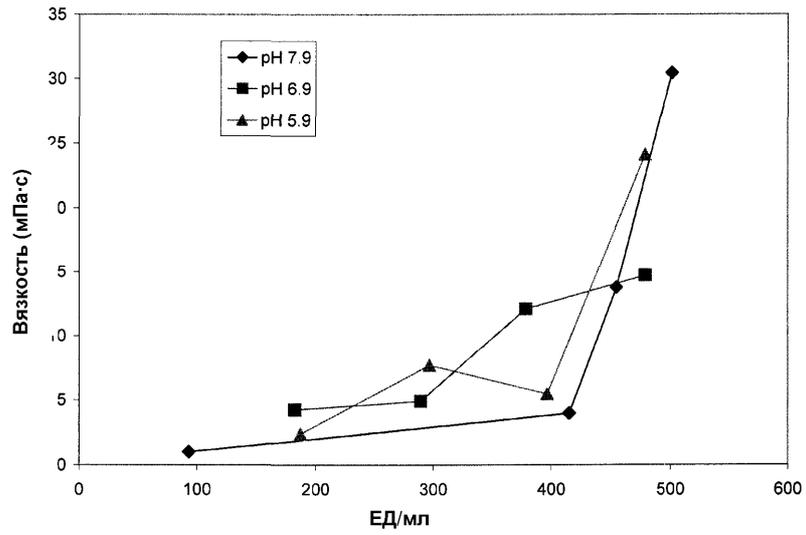
14. Применение по любому из пп.8-13, отличающееся тем, что указанный ингибитор С1 эстеразы вводят в дозе от 500 до 5000 единиц, от 1000 до 3500 единиц или от 1500 до 2500 единиц.

```

1 MASRLTLLTL LLLLLAGDRA SSNPATSSS SQDPESLQDR GEGKVATTVI SKMLFVEPIL
61 EVSSLPTTNS TTNSATKITA NTTDEPTTQP TTEPTTQPTI QPTQPTTQLP TDSPTQPTTG
121 SFCPGPVTLT SDLESHSTEA VLGDALVDFS LKLYHAFSAM KKVETNMAFS PFSIASLLTQ
181 VLLGAGENTK TNLESTLSYP KDFTCVHQAL KGFTTKGVTS VSQIFHSPDL AIRDTFVNAS
241 RTLYSSSPRV LSNNSDANLE LINTWVAKNT NNKISRLLDS LPSDTRLVLL NAIYLSAKWK
301 TTFDPKKTRM EPFHFKNSVI KVPMMNSKKY PVAHFIDQTL KAKVQQLQLS HNLSLVILVP
361 QNLKHRLEDM EQALSPSVFK AIMEKLEMSK FQPTLLTLPR IKVTTSQDML SIMEKLEFFD
421 FSYDLNLCGL TEDPDLQVSA MQHQTVLELT ETGVEAAAAS AISVARTLLV FEVQQPFLFV
481 LWDQQHKFPV FMGRVYDPRA

```

Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
