

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043419**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.24

(21) Номер заявки
202090731

(22) Дата подачи заявки
2018.09.10

(51) Int. Cl. *A61K 9/19* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО БЕЛКА

(31) 62/559,420

(32) 2017.09.15

(33) US

(43) 2020.06.11

(86) PCT/US2018/050305

(87) WO 2019/055357 2019.03.21

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

(72) Изобретатель:
Талли Клеа (US)

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

(56) WO-A1-2013096791
US-A1-2016000921

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения лиофилизированного фармацевтического состава на основе терапевтического белка, который включает (a) получение состава с нерасфасованным количеством терапевтического белка, (b) измерение концентрации терапевтического белка в указанном нерасфасованном составе, (c) определение заполняемой массы указанного нерасфасованного состава с получением целевой фиксированной дозы терапевтического белка в контейнере и (d) лиофилизацию состава в контейнере. Заполняемую массу в стадии (c) определяют следующей формулой:

$$\text{заполняемая масса [г]} = \frac{(\text{целевая фиксированная доза терапевтического белка [мг]} \times \text{плотность [г/мл]})}{\text{концентрация терапевтического белка в нерасфасованном составе [мг/мл]}}$$

043419

B1

043419
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биофармацевтическим препаратам, в частности к терапевтическим белкам, способам их применения, фармацевтическим составам на их основе и способам получения фармацевтических составов. В частности, настоящее изобретение относится к способам получения лиофилизированных фармацевтических составов.

Предпосылки создания изобретения

За последние десять лет развитие технологий сделало возможным получение разнообразных активных молекул для фармацевтических путей применения. Поскольку понимание природы механизмов биологического действия прогрессирует, эти молекулы можно разрабатывать с определенными свойствами, с которыми небольшие количества продукта могут быть эффективными.

Поскольку эти молекулы могут быть более крупными и/или более сложными, чем традиционные органические и неорганические лекарственные средства (т.е. содержать несколько функциональных групп в дополнение к сложным трехмерным структурам), составление таких продуктов создает особые проблемы. Чтобы продукт оставался биологически активным, в составе должна сохраняться неизменной конформационная целостность по меньшей мере сердцевинной последовательности аминокислот белка с защитой в то же время этих нескольких функциональных групп белка от разрушения. Пути разрушения белков могут предусматривать химическую нестабильность (т.е. любой процесс, который включает модификацию белка посредством образования или расщепления связей, что приводит к образованию нового химического объекта) или физическую нестабильность (т.е. изменения структуры белка высшего порядка). Химическая нестабильность может быть результатом дезамидирования, рацемизации, гидролиза, окисления, бета-элиминирования или дисульфидного обмена. Физическая нестабильность может быть результатом, например, денатурации, агрегации, осаждения или адсорбции. Тремя наиболее распространенными путями разрушения белков являются агрегация, дезамидирование и окисление белков. Cleland et al. (1993), *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377.

Эти разработанные молекулы ввиду их синтетической природы являются преимущественно лиофилизированными (высушенными посредством сублимации), так как данная форма выпуска может обеспечивать улучшенную стабильность при хранении. Сублимационная сушка представляет собой обычно используемую методику сохранения белков, которая служит для удаления воды из белкового препарата, представляющего интерес. Сублимационная сушка или лиофилизация представляет собой способ, с помощью которого материал, который должен быть высушен, сначала замораживают, а затем ледяной или замороженный растворитель удаляют посредством сублимации в вакуумной среде. В предварительно лиофилизированные составы может быть включено вспомогательное вещество для повышения стабильности во время процесса сублимационной сушки и/или для улучшения стабильности лиофилизированного продукта при хранении. Pikal, M. (1990), *Biopharm.* 3(9)26-30 и Arakawa et al. (1991), *Pharm. Res.* 8(3):285-291.

Разработанная молекула с конкретными биологическими мишенями и вытекающими из этого требованиями к дозировке продукта создает новые проблемы для способа изготовления. Существующий уровень техники включает простой способ, где продукт составляют до целевой концентрации и затем разливают в контейнеры с заданным объемом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на способ получения лиофилизированного лекарственного препарата. В частности, оно относится к составлению, разливанию и обеспечению требуемого количества продукта, присутствующего после восстановления с помощью фиксированного объема разбавителя для лиофилизированного продукта для применения.

В соответствии с настоящим изобретением предусмотрен способ получения лиофилизированного фармацевтического состава на основе терапевтического белка, который включает получение состава с нерасфасованным количеством терапевтического белка, измерение концентрации терапевтического белка в указанном нерасфасованном составе, корректировку заполняемой массы белка в указанном нерасфасованном составе с получением фиксированной дозы белка и

лиофилизацию состава со скорректированной заполняемой массой белка с получением конечного состава в контейнере,

где концентрация продукта после восстановления с помощью фиксированного объема находится в пределах предварительно определенного диапазона приемлемых значений.

В вышеуказанном способе концентрация белка в конечном составе предпочтительно является равной приблизительно 20 или 25 мг/мл или меньше, при этом наиболее предпочтительно она составляет приблизительно 0,5 мг/мл, приблизительно 0,05 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 20 мг/мл и приблизительно 21 мг/мл. Предпочтительные терапевтические белки в способах согласно настоящему изобретению представляют собой ромиплостим, блинатумомаб, инфликсимаб, трастузумаб, AMG 701 и AMG 330. AMG 701 и AMG 330 представляют собой биспецифические конструкции на основе одноцепочечных антител, и другие биспецифические конструкции на основе одноцепочечных антител (например, биспецифические активаторы, привлекающие Т-клетки) представляют собой предпочтитель-

ные терапевтические белки в способах по настоящему изобретению. Предпочтительные фармацевтические вспомогательные вещества, присутствующие в составе, включают в себя сахара, при этом наиболее предпочтительными являются трегалоза, сахароза и гидрат любого из них. Предпочтительные фармацевтические вспомогательные вещества также включают в себя буферные вещества, при этом предпочтительными являются гистидин, моногидрат лимонной кислоты, фосфат натрия, фосфат калия и глутаминовая кислота. Предпочтительные вспомогательные вещества дополнительно включают в себя поверхностно-активные вещества, при этом наиболее предпочтительными являются полисорбат 20 и полисорбат 80. Предпочтительные вспомогательные вещества и терапевтические белки, применяемые в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, представлены в табл. 1 с предпочтительными приблизительными концентрациями каждого перечисленного ниже белка и вспомогательного вещества.

Таблица 1

Предпочтительные компоненты состава

Белок	Сахар	Буферное вещество	Объемообразующее средство/ солубилизирующее средство	Поверхностно-активное вещество	pH
Ромиплостим, 0,5 мг/мл	Сахароза, 2% вес/объем	Гистидин, 10 мМ	Маннит, 4% вес/объем	Полисорбат 20, 0,004% вес/объем	5,0
Блинатумомаб, 55 мкг/мл	Трегалоза, 15% вес/объем	Моногидрат лимонной кислоты, 25 мМ; гидрохлорид L-лизина, 200 мМ	--	Полисорбат 80, 0,1% вес/объем	7,0
Инфликсимаб, 20 ± 1,5 мг/мл	Сахароза, 10% вес/объем	Фосфат натрия, 10 мМ	--	Полисорбат 80, 0,01% вес/объем	7,2
Трастузумаб, 21 мг/мл	Дигидрат α,α-трегалозы, 19,1 мг/мл	Гистидин, 0,303 мг/мл; моногидрат гидрохлорида L-гистидина, 0,470 мг/мл	--	Полисорбат 20, 0,0840 мг/мл	6,1
AMG 701, 1 мг/мл	Сахароза, 9% вес/объем	L-глутаминовая кислота, 10 мМ	--	Полисорбат 80, 0,010% вес/объем	4,2
AMG 330, 0,5 мг/мл	Сахароза, 8% вес/объем	Фосфат калия, 10 мМ	SBE-CD, 1% вес/объем	Полисорбат 80, 0,010% вес/объем	6,1

В соответствии с настоящим изобретением состав может дополнительно содержать другие вспомогательные вещества, описанные в данном документе ниже.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой карту поверхности отклика, на которой показано иллюстративное проектное поле для низкодозированного продукта, в котором параметры состава и заполняемая масса будут соответствовать типичной стратегии контроля. Серая область представляет область, в которой изменчивость способа/восстановления будет характеризоваться более чем 50% вероятностью получения ошибочного результата подбора концентрации белка. В большом квадрате показан текущий рабочий диапазон для разработки состава. В меньшем прямоугольнике показан эффективный рабочий диапазон.

Фиг. 2 представляет собой карту поверхности отклика, на которой показано иллюстративное проектное поле для низкодозированного продукта, в котором рассматривается осмоляльность в дополнение к концентрации нерасфасованного продукта и заполняемому объему. В светло-сером участке показана спецификация по концентрации в лекарственном препарате с увеличенным шагом, где изменчивость способа/восстановления будет характеризоваться более чем 50% вероятностью получения ошибочного результата подбора концентрации белка. В темно-серой зоне показана спецификация по осмоляльности. В прямоугольнике показан диапазон проектного поля для заполняемой массы (ось x) и концентрации в нерасфасованном составе (ось y) в рабочем диапазоне для внутрипроизводственного контроля (IPC) с пределом предупреждения (ALOR).

Фиг. 3 представляет собой карту поверхности отклика, на которой показан пример пригодной, но не устойчивой к ошибкам стратегии контроля заполняемой массы и параметров состава. С помощью кривой и двунаправленной стрелки показана вероятная ошибка целевого параметра заполнения. В светло-серой зоне представлена спецификация по концентрации в лекарственном препарате с увеличенным шагом, при этом в светло-серой зоне показано, где изменчивость способа/восстановления будет характеризоваться более чем 50% вероятностью получения ошибочного результата подбора концентрации белка. В темно-серой зоне определена спецификация по осмоляльности. В прямоугольнике показан IPC/ALOR.

Фиг. 4 представляет собой карту поверхности отклика, на которой показан пример стратегии контроля заполняемой массы и параметров состава с затрудненным контролем порогов диапазона с ожидаемой меньшей концентрацией в нерасфасованном составе и меньшей заполняемой массой. С помощью левой кривой и двунаправленной стрелки показана вероятная ошибка целевого параметра заполнения при низком заполняемом объеме. С помощью правой кривой и двунаправленной стрелки показана вероятная ошибка целевого параметра заполнения при большем заполняемом объеме. В светло-серой зоне представлена спецификация по концентрации в лекарственном препарате с увеличенным шагом, при этом в светло-серой зоне показано, где изменчивость способа/восстановления будет характеризоваться более чем 50% вероятностью получения ошибочного результата подбора концентрации белка. В темно-серой зоне определена спецификация по осмоляльности. В прямоугольнике показан IPC/ALOR.

Фиг. 5 представляет собой карту поверхности отклика, на которой показан пример комбинированной стратегии использования результата подбора концентрации в нерасфасованном составе для последующей корректировки заданного значения заполняемой массы с учетом общей дозы продукта в целевом флаконе, которая в результате приводит к пригодному, устойчивому к ошибкам способу получения лиофилизованного лекарственного средства. С помощью кривой и двунаправленной стрелки показана вероятная ошибка целевого параметра заполнения. В светло-серой зоне определена спецификация по концентрации в лекарственном препарате с увеличенным шагом, как показано на фиг. 1-4. В темно-серой зоне определена спецификация по осмоляльности. В ромбоиде показан IPC/ALOR, усеченный спецификацией по осмоляльности при наибольших заполняемых объемах в пределах IPC/ALOR.

На фиг. 6 показана концентрация белкового продукта после восстановления в зависимости от нормализованных значений заполняемой массы, как определено в соответствии с примером 1 далее в данном документе.

На фиг. 7 показана осмоляльность в зависимости от нормализованных значений заполняемой массы, как определено в соответствии с примером 1 далее в данном документе.

Подробное описание изобретения

Определение терминов

В последующем описании широко используется ряд терминов. Для облегчения понимания настоящего изобретения приведены следующие определения.

Если не указано иное, то форма единственного числа существительных и выражение "по меньшей мере один" используются взаимозаменяемо и означают один или больше одного. Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе будут включать их формы во множественном числе, а термины во множественном числе будут включать их формы в единственном числе.

Как используется в данном документе, "фармацевтический состав" или "состав" представляет собой стерильную композицию из (i) фармацевтически активного лекарственного средства, такого как биологически активный белок, который является подходящим для парентерального введения (в том числе без ограничения внутривенного, внутримышечного, подкожного, аэрозольного, внутривнегочного, интраназального и интратекального введения) пациенту, нуждающемуся в этом, и (ii) одного или нескольких фармацевтически приемлемых наполнителей, разбавителей и других добавок, которые считаются безопасными Федеральным управлением по лекарственным средствам или другими иностранными нацио-

нальными органами. Фармацевтические составы включают в себя жидкие (например, водные) растворы, которые можно непосредственно вводить, и лиофилизированные порошки, которые можно восстанавливать до растворов посредством добавления разбавителя перед введением. Из термина "фармацевтический состав", тем не менее, определенным образом исключены композиции для местного введения пациентам, композиции для перорального приема и композиции для парентерального питания.

"Срок годности при хранении", как используется в данном документе, означает период хранения, во время которого активный ингредиент (например, антигено) в фармацевтическом составе характеризуется минимальным разрушением (например, разрушением, составляющим не более чем приблизительно 5-10%) при хранении фармацевтического состава в указанных условиях хранения (например, 2-8°C). Методики оценки разрушения варьируются в зависимости от природы белка в фармацевтическом составе. Иллюстративные методики включают HPLC в режиме эксклюзионной хроматографии (SEC) для выявления, например, агрегации; обращенно-фазовую (RP) HPLC для выявления, например, фрагментации белка; ионообменную HPLC для выявления, например, изменений заряда белка; а также масс-спектрометрию, флуоресцентную спектроскопию, спектроскопию кругового дихроизма (CD), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (FT-IR) и рамановскую спектроскопию для выявления конформационных изменений белка. Все эти методики можно применять по отдельности или в комбинации для оценки разрушения белка в фармацевтическом составе и определения срока годности при хранении этого состава. Фармацевтические составы по настоящему изобретению предпочтительно проявляют не более чем приблизительно 5-10% увеличение разрушения (например, фрагментации, агрегации или разворачивания) в течение двух лет при хранении при 2-8°C.

Как используется в данном документе, "стабильные" составы биологически активных белков представляют собой составы, которые проявляют (i) снижение агрегации и/или снижение потери биологической активности на по меньшей мере 20% при хранении при 2-8°C в течение по меньшей мере 2 лет по сравнению с контрольным образцом состава либо (ii) снижение агрегации и/или снижение потери биологической активности в условиях термического стресса (например, 25°C в течение от 1 недели до 12 недель; 40°C в течение 1-12 недель; 52°C в течение 7-8 дней и т. д.). В одном варианте осуществления состав считается стабильным, если белок в составе сохраняет свою физическую стабильность, химическую стабильность и/или биологическую активность.

Можно сказать, что белок "сохраняет свою физическую стабильность" в составе, если, например, он не демонстрирует признаков агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном изучении цвета и/или прозрачности или при измерении посредством рассеяния UV-излучения или с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) или электрофореза, как, например, в отношении мутности или образования агрегатов.

Можно сказать, что белок "сохраняет свою химическую стабильность" в составе, если, например, химическая стабильность в определенный момент времени является такой, что в результате модификации белка посредством образования или расщепления связей не образуется новый химический объект. В дополнительном варианте осуществления определения химической стабильности можно оценивать посредством выявления и количественного определения химически измененных форм белка. Химическое изменение может включать, например, изменение размера (например, усечение), которое можно оценивать с применением эксклюзионной хроматографии, SDS-PAGE и/или матрично-активированной лазерной десорбции-ионизации/времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают, например, изменение заряда (например, в результате дезамидирования), которое можно оценивать с помощью ионообменной хроматографии. Окисление представляет собой другую часто наблюдаемую химическую модификацию.

Можно сказать, что белок "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтическом составе по сравнению с немодифицированным белком, если, например, процентное значение биологической активности составленного белка (например, антигена), определенное с помощью анализа (например, анализа связывания антигена), по сравнению с контрольным раствором составляет от приблизительно 50% до приблизительно 200%, от приблизительно 60% до приблизительно 170%, от приблизительно 70% до приблизительно 150%, от приблизительно 80% до приблизительно 125% либо от приблизительно 90% до приблизительно 110%. В дополнительном варианте осуществления можно сказать, что белок "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтическом составе, если, например, без ограничения, биологическая активность белка в определенный момент времени составляет по меньшей мере 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%.

Используемые в данном документе термины "содержащий" и "содержит" предназначены для обозначения того, что составы и способы включают перечисленные элементы, но не исключают другие перечисленные элементы. Термины "фактически состоящий из" и "фактически состоит из", используемые для определения составов и способов, включают перечисленные элементы, исключают перечисленные элементы, которые изменяют основную природу состава и/или способа, но не исключают другие перечисленные элементы. Таким образом, состав, фактически состоящий из элементов, определенных в данном документе, не будет исключать следовые количества других элементов, таких как загрязняющие вещества после каких-либо способов выделения и очистки или фармацевтически приемлемые носи-

тели (например, фосфатно-солевой буферный раствор), консерванты и т. п., но будет исключать, например, дополнительные неуказанные аминокислоты. Термины "состоящий из" и "состоит из", используемые для определения составов и способов, исключают элементы в более чем следовых количествах из других ингредиентов и существенных стадий способа введения композиций, описанных в данном документе. Варианты осуществления, определенные каждым из этих переходных терминов, находятся в пределах объема настоящего раскрытия и изобретения, воплощенного в данном документе.

Используемый в данном документе термин "выделенный" относится к белку (например, антителу), который был идентифицирован и отделен и/или извлечен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой материалы, которые будут препятствовать диагностическим или терапевтическим путям применения белка, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления белок будет очищен (1) до более чем 95% по весу антитела, как определено с помощью метода Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по весу, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности согласно SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением кумасси синего или, предпочтительно, серебряного красителя. Выделенный белок включает белок *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент природной среды белка будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенный белок получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Настоящее изобретение относится к способам получения фармацевтических составов на основе терапевтических белков, таких как антитела. "Антитела" (Ab) и их синоним "иммуноглобулины" (Ig) представляют собой гликопротеины, имеющие одинаковые структурные характеристики. Хотя антитела проявляют специфичность связывания с конкретным антигеном, иммуноглобулины включают как антитела, так и другие антителоподобные молекулы, которые лишены антигенной специфичности. Полипептиды последнего типа, например, продуцируются на низких уровнях в лимфатической системе и на увеличенных уровнях в миеломах. Таким образом, используемый в данном документе термин "антитело" или "пептид(пептиды) антитела" относится к интактному антителу, производному антитела, аналогу антитела, генетически измененному антителу, антителу, имеющему детектируемую метку, антителу, которое конкурирует за специфическое связывание с антигеном, раскрытым в данном описании, или его антигенсвязывающему фрагменту (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменному антителу), который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, и включает химерные, гуманизированные, полностью человеческие и биспецифические антитела. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты получают, например, с помощью методик рекомбинантной ДНК. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты получают посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Антигенсвязывающие фрагменты включают без ограничения Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела.

Используемый в данном документе термин "интактные антитела" относится к антителам, содержащим две тяжелые цепи и две легкие цепи. Таким образом, этот термин включает без ограничения полностью человеческие антитела, генетически измененные антитела, биспецифические антитела и производные антител, при условии, что такие антитела содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничен антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, в том числе любого эукариотического, прокариотического или фагового клона, а не к способу его получения.

Моноклональные антитела и конструкции на основе антител, составленные в соответствии с настоящим изобретением, конкретно включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al. (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855). Химерные антитела, представляющие интерес в данном документе, включают "приматизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности варибельного домена, полученные от примата, отличного от человека (например, маргышковых, человекообразных обезьян и т. д.), и последовательности человеческих константных областей. Были описаны разнообразные подходы к получению химерных антител. См., например, Morrison et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851; Takeda et al. (1985), Nature 314:452, Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494; а также GB 2177096.

Моноклональные антитела и конструкции на основе антител, составленные в соответствии с настоящим изобретением, конкретно включают антитела, называемые "человеческими" или "полностью человеческими". Каждый из терминов "человеческое антитело" и "полностью человеческое антитело"

относится к антителу, которое имеет аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, в том числе к антителам, выделенным из библиотек человеческих иммуноглобулинов или от животных, трансгенных по одному или нескольким человеческим иммуноглобулинам, которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины; например, антителам XenoMouse® и антителам, описанным Kucherlapati и соавт. в патенте США № 5939598.

Термин "генетически измененные антитела" означает антитела, аминокислотная последовательность которых отличается от аминокислотной последовательности нативного антитела. Ввиду значимости методик рекомбинантной ДНК для получения антител не следует ограничиваться последовательностями аминокислот, обнаруживаемыми в природных антителах; антитела можно переконструировать с получением желаемых характеристик. Существует множество возможных видоизменений, и они варьируются от изменений всего одной или нескольких аминокислот до полного переконструирования, например, вариабельной и/или константной области. Изменения константной области, как правило, будут осуществляться с целью улучшения или изменения таких характеристик, как фиксация комплемента, взаимодействие с мембранами и другие эффекторные функции, а также технологичность изготовления и вязкость. Изменения вариабельной области будут осуществляться с целью улучшения характеристик связывания с антигеном.

"Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи, а также C_{H1} и вариабельных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

"Fab'-фрагмент" содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, которая содержит большую часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что между двумя тяжелыми цепями может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы $F(ab')_2$.

" $F(ab')_2$ -фрагмент" содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так что между двумя тяжелыми цепями образуется межцепочечная дисульфидная связь.

Термины "Fv-фрагмент" и "одноцепочечное антитело" относятся к полипептидам, которые содержат вариабельные области антитела как из тяжелой, так и из легкой цепей, но лишены константных участков. Подобно целому антителу, они способны селективно связываться с конкретным антигеном. При молекулярной массе, составляющей лишь приблизительно 25 кДа, Fv-фрагменты являются намного меньшими, чем обычные антитела (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньшими, чем Fab-фрагменты (приблизительно 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи).

"Однодоменное антитело" представляет собой фрагмент антитела, состоящий из однодоменного Fv-звена, например, V_H или V_L . Подобно целому антителу, они способны селективно связываться с конкретным антигеном. При молекулярной массе, составляющей лишь 12-15 кДа, однодоменные антитела являются намного меньшими, чем обычные антитела (150-160 кДа), которые состоят из двух тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньшими, чем Fab-фрагменты (приблизительно 50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и одноцепочечные вариабельные фрагменты (приблизительно 25 кДа, два вариабельных домена, один из легкой и один из тяжелой цепи). Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител, состоящих только из тяжелых цепей, которые обнаружены у верблюдовых. Хотя большинство исследований однодоменных антител в настоящее время проводится с использованием вариабельных доменов тяжелой цепи, было показано, что вариабельные домены легкой цепи и нанотела, полученные из легких цепей, также специфично связываются с эпитопами-мишенями.

Используемый в данном документе термин "биспецифический" означает конструкцию на основе антитела, которая является "по меньшей мере биспецифической", т.е. она содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или одной мишенью (например, CD3), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или другой мишенью (например, BCMA; например, CD33). Соответственно конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением обладают специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных антигенов или мишеней. Термин "биспецифическая конструкция на основе антитела" по настоящему изобретению также охватывает полиспецифические конструкции на основе антител, такие как триспецифические конструкции на основе антител, где последние содержат три связывающих домена, или конструкции с более чем тремя (например, четырьмя, пятью и т. д.) видами специфичности.

С учетом того, что конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются в природе и заметно отличаются от продуктов, встречающихся в природе. Следовательно, "биспецифические" конструкции на основе антитела или иммуноглобулинов представляют собой искусственное гибридное антитело или иммуноглобулин с по меньшей мере двумя различными связывающими участками с различной специфичностью. Биспецифические конструкции на основе антител можно получать с помощью разнообразных способов, в том числе слияния гибридом или связывания Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

По меньшей мере два связывающих домена и переменных домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотную последовательность, с помощью которой аминокислотные последовательности одного (вариабельного и/или связывающего) домена и другого (вариабельного и/или связывающего) домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связываются друг с другом. Важной технической особенностью такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует какая-либо полимеризационная активность. Среди подходящих пептидных линкеров находятся те, которые описаны в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно применять для присоединения других доменов, или модулей, или областей (таких как домены, увеличивающие период полувыведения) к конструкции на основе антитела по настоящему изобретению.

В случае применения линкера этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточную для обеспечения того, чтобы каждый из первого и второго доменов мог независимо от другого сохранять свою дифференциальную специфичность связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена (или два переменных домена) в конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, предпочтительными являются те пептидные линкеры, которые содержат лишь небольшое количество аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или меньше. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предполагается, что пептидный линкер с менее чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, при этом предпочтительными являются Gly-богатые линкеры. Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в случае с указанным "пептидным линкером" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из единственной аминокислоты Gly. Другой предпочтительный вариант осуществления пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, равное 1 или больше (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры показаны под SEQ ID NO: 1-9. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие способствования образованию вторичных структур, известны из уровня техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol. Immunol. (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые, помимо прочего, не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Связь указанных доменов друг с другом можно обеспечивать, например, с помощью генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и обеспечения их экспрессии в клетках млекопитающих или бактерий хорошо известны из уровня техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления и как документально подтверждено в прилагаемых примерах, каждая из конструкций на основе антител AMG 701 и AMG 330 по настоящему изобретению представляет собой "биспецифическую конструкцию на основе одноцепочечного антитела", более предпочтительно биспецифический "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, описанного в данном документе выше, позволяющего им образовывать единую белковую цепь, в которой VL- и VH-участки спариваются с образованием моновалентной молекулы; см., например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают, применяя традиционные методики, известные специалистам в данной области, и фрагменты оценивают в отношении функции таким же образом, как и целые или полноразмерные антитела. Следовательно, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок на основе переменных областей тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно соединенных коротким линкерным пептидом длиной от приблизительно десяти до приблизительно 25 аминокислот, предпочтительно приблизительно 15-20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может соединять N-конец VH с C-концом VL либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера.

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны из уровня техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brihl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Методики, описанные для получения одноцепочечных антител (см., помимо прочего, патент США 4946778), можно адаптировать для получения конструкций на основе одноцепочечных антител, специфично распознающих выбранную(выбранные) мишень(мишени).

Бивалентные (также называемые двухвалентными) или биспецифические одноцепочечные переменные фрагменты (би-scFv или ди-scFv в формате (scFv)₂) можно конструировать посредством связывания двух молекул scFv (например, с линкерами, описанными в данном документе выше). Если эти две

молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, то получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться бивалентной (т.е. она имеет две валентности для одного и того же эпитопа-мишени). Если две молекулы scFv имеют различную специфичность связывания, то получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться биспецифической. Связывание можно осуществлять посредством получения одной пептидной цепи с двумя VH-областями и двумя VL-областями, в результате чего образуются тандемные scFv (см., например, Kufer P. et al. (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, которые являются слишком короткими для того, чтобы две переменные области сворачивались вместе (например, длиной приблизительно пять аминокислот), что вынуждает scFv димеризоваться. Этот тип известен как диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al. (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

Как описано в данном документе выше, в настоящем изобретении предусмотрен предпочтительный вариант осуществления, где конструкция на основе антитела имеет формат, выбранный из группы, состоящей из (scFv)₂, scFv, однодоменного mAb, диател и олигомеров в любом из этих форматов.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению тяжелая цепь (VH) и легкая цепь (VL) связывающего домена, связывающегося с антигеном-мишенью CD3 и CD33 либо с ВСМА, не являются непосредственно соединенными с помощью описанного выше пептидного линкера, но связывающий домен образуется вследствие образования биспецифической молекулы, как описано для диателы. Таким образом, VH-цепь связывающего домена для CD3 может быть слита с VL связывающего домена для CD33 или ВСМА с помощью такого пептидного линкера, тогда как VH-цепь связывающего домена для CD3 слита с VL связывающего домена для CD33 или ВСМА с помощью такого пептидного линкера.

Термины "аминоконцевой" и "карбоксиконцевой" и их сокращенные формы "N-конец" и "С-конец" используются в данном документе для обозначения положений в полипептидах. Если это позволяет контекст, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, размещенная в направлении карбокси-конца относительно эталонной последовательности в полипептиде, расположена со стороны карбоксильного конца эталонной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полноразмерного полипептида.

Используемый в данном документе термин "аминокислота" относится к природным и/или неприродным либо синтетическим аминокислотам, включающим глицин и оптические как D-, так и L-изомеры, аналоги аминокислот и пептидомиметики, в том числе без ограничения N-ацетил-аналоги оптических D- или L-изомеров (например, N-ацетиларгинин). В некоторых аспектах термин "аминокислота" относится к мономерным аминокислотам.

Как правило, номенклатура, используемая применительно к культивированию клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, а также химии и гибридизации белков и нуклеиновых кислот, и методики, относящиеся к ним, которые описаны в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Способы и методики по настоящему изобретению, как правило, осуществляют в соответствии с традиционными способами, хорошо известными из уровня техники и описанными в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируются и обсуждаются на протяжении всего настоящего описания, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., и Ausubel et al. (1992), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, а также Harlow and Lane (1990), Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Любые ферментативные реакции и методики очистки осуществляют в соответствии со спецификацией производителя, как обычно выполняется в данной области техники или как описано в данном документе. Терминология, используемая применительно к аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, и лабораторные процедуры и методики, относящиеся к ним, которые описаны в данном документе, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Стандартные методики можно применять для химических синтезов, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

Применение промежуточных концентраций в составах

Цель получения белкового состава состоит в превращении высокоочищенного раствора рекомбинантного белка (лекарственного вещества) в стабильную, эффективную биофармацевтическую дозированную форму. Kamerzell et al. (2011), 63(13): 1118-59 (включено посредством ссылки). Первая стадия, часто называемая получением характеристик перед составлением, включает определение физико-химических свойств белка и путей его нестабильности, что позволяет разрабатывать составы, содержащие различные вспомогательные вещества, для обеспечения стабильности белка в определенных условиях хранения. Вместе с этим необходимо разрабатывать аналитические способы для отслеживания физико-химической целостности и биологической активности белка в условиях составления (например, в присутствии вспомогательных веществ) наряду со спецификациями для определения приемлемых огра-

ничений для любых изменений этих параметров. Конкретные составы с различными концентрациями белка с целевыми уровнями различных фармацевтических вспомогательных веществ затем тестируют в экспериментальных условиях, чтобы убедиться в стабильности, растворимости и тоничности в течение срока годности при хранении. Кроме того, выбирают первичный контейнер (например, флакон, картридж или предварительно заполненный шприц) для хранения смеси белка и вспомогательного вещества и облегчения парентерального введения пациентом или медицинским работником. Вся биофармацевтическая лекарственная или вакцинная дозированная форма (белок, вспомогательные вещества, первичный контейнер и устройство для доставки) должна быть разработана как с масштабируемостью, что обеспечивает возможность коммерческого производства в стерильных условиях, так и в соответствии со всеми нормативными рекомендациями по получению и тестированию биофармацевтических дозированных форм для применения в медицине.

Как правило, разработка состава начинается с идентификации подходящего pH и буферной системы с помощью стратегии биофизического скрининга. Буферные вещества добавляют к раствору белка для стабилизации pH, что, в свою очередь, стабилизирует белок, поскольку стабильность белка, как правило, связана с характерным узким диапазоном pH. См. Garidel and Bassarab (2009), "Impact of formulation design on stability and quality," в: *Quality for Biologics: Critical Quality Attributes, Process and Change Control, Production Variation, Characterisation, Impurities and Concerns*, Biopharm Knowledge Publishing, London, UK, pp. 94-113 (включено посредством ссылки). В забуференный раствор белка затем добавляют другие вспомогательные вещества для составов, такие как стабилизаторы (например, сахара), объемобразующие средства (например, маннит) и поверхностно-активные вещества (например, полисорбат 20). В случае с лиофилизированным составом такую смесь для составления в жидкой форме затем лиофилизируют.

При лиофилизации, как и в других способах получения лекарственных препаратов, ключевым контрольным параметром является заполняемая масса терапевтического белка для доставки требуемой дозы пациенту. Для продуктов с более высокой концентрацией приемлемой является простая стратегия контроля концентрации продукта на стадии составления с последующим контролем заполняемой массы в качестве части процесса заполнения. Однако, для доставки очень низкой дозы продукта величиной в несколько микро- или даже миллиграммов эта простая стратегия для обеспечения доставки дозы начинает испытывать проблемы в обеспечении возможности получения пациентом требуемой дозы. Связанные с этим опасения заключаются в том, что этикетка продукта может не отражать состав продукта внутри контейнера, и что может возникнуть затруднение при извлечении материала для дозирования. Следовательно, существует потребность в способе, обеспечивающем больший контроль над заполняемой массой терапевтического белка в лиофилизированном фармацевтическом составе.

Как отмечено выше, простая стратегия контроля концентрации продукта на стадии составления, за которой следует контроль заполняемой массы в качестве части процесса заполнения, является приемлемой для более высоких концентраций терапевтического белка, но может приводить к проблемам при более низких концентрациях. Проектное поле для контроля заполняемой массы для низкодозированного продукта, когда целевые параметры заполняемой массы и состава контролируются по отдельности, демонстрирует более высокую изменчивость с большей правдоподобностью того, что продукт не будет соответствовать спецификации для выпуска продукта. Вследствие изменчивости процесса изготовления точный контроль нерасфасованного состава недостижим из-за масштаба процесса и свойственной оборудованию изменчивости при изготовлении. Другая проблема состоит в том, что лиофилизированному продукту свойственна увеличенная изменчивость, поскольку продукт должен быть восстановлен, что также является изменчивым процессом.

Типичная стратегия контроля (показанная на фиг. 1) будет характеризоваться более чем 50% вероятностью получения ошибочного результата подбора концентрации белка. На фиг. 1 наблюдаемая общая изменчивость данных об однородности лиофилизированного продукта составляет 0,01 мг/мл. Для обеспечения минимальной возможности средний рабочий диапазон должен быть ограничен таким образом, чтобы он соответствовал диапазону спецификации "с увеличением шага" до $3 \times 0,01 = 0,03$ мг/мл. Целевой процесс в белом поле характеризуется качеством, при котором на одну партию приходится менее 0,1% флаконов, не соответствующих спецификации (OOS). В отличие от этого, целевой процесс в закрашенной зоне характеризуется более высокими показателями OOS. Как можно видеть на фиг. 1, текущий рабочий диапазон (большой квадрат) содержит пороги допустимости для желаемого состава. Эффективный рабочий диапазон (меньший прямоугольник на фиг. 1), однако, требует более жестких допусков по заполнению, чем можно достигнуть как в рамках изменчивости состава, так и в рамках контроля заполняемой массы.

Таким образом, процесс, при котором также необходимо рассматривать другие показатели качества продукта (например, осмоляльность, pH), а также концентрацию белка, может быть нереализуемым или непригодным при использовании стандартной методологии. На фиг. 2 показано иллюстративное проектное поле, в котором рассматривается спецификация по осмоляльности. Серым цветом показаны широкие условия получения ошибочного результата в рамках рабочего диапазона для IPC с пределом предупреждения.

Стандартная методология может также приводить к пригодной, но не устойчивой к ошибкам стра-

тегии контроля заполняемой массы и параметров состава (см. фиг. 3). Как показано на фиг. 1, IPC/ALOR содержит зоны, которые не соответствуют спецификации по концентрации в лекарственном препарате. В пределах зоны несоответствия спецификации по концентрации в лекарственном препарате (белой зоны в пределах IPC/ALOR) остается очень небольшое пространство для ошибки целевого параметра заполнения. Таким образом, как показано на фиг. 3, стандартная методология может приводить к процессу с затрудненным контролем порогов диапазона, пригодному, но без достаточной устойчивости к ошибкам.

Увеличение заполняемого объема может быть недостаточным изменением процесса для создания пригодного состава с приемлемой устойчивостью к ошибкам. Фиг. 4 представляет собой карту поверхности отклика, на которой заполняемый объем увеличен. Диапазон целевого параметра заполнения можно привести в соответствие с IPC/ALOR и спецификациями продукта, но устойчивость к ошибкам может оставаться неприемлемой. Диапазон заполняемой массы в допустимом диапазоне концентрации в нерасфасованном составе имеет недостаточную устойчивость к ошибкам.

Если результат подбора концентрации в нерасфасованном составе используют для последующей корректировки заполняемой массы терапевтического белка, рабочий диапазон можно изменить настолько, чтобы обеспечить получение состава, являющегося как пригодным, так и достаточно устойчивым к ошибкам. Как показано на фиг. 5, модифицированный рабочий диапазон (IPC/ALOR) позволяет ожидаемому диапазону целевого параметра заполнения находиться в пределах спецификаций по концентрации и осмоляльности. Таким образом, диапазон целевого параметра заполнения может быть представлен в пределах спецификаций по концентрации и другим параметрам с достаточной устойчивостью к ошибкам.

До настоящего времени эту методику применяли для определения единицы складского хранения (SKU) низких доз применительно к SKU для низкодозированного ромиплостима (Nplate®), блинатумаба (Blincyto®), инфликсимаба и трастузумаба. Подробности применения этой методики представлены в разделе "Демонстрационные примеры" далее в данном документе.

Вспомогательные вещества в целом

Одной из задач при получении составов является стабилизация продукта от видов стресса при изготовлении, перевозке и хранении, которую можно реализовать с помощью определенных вспомогательных веществ для составов. В целом, вспомогательные вещества можно классифицировать на основе механизмов, посредством которых они стабилизируют белки от различных видов химического и физического стресса. Некоторые вспомогательные вещества смягчают эффекты конкретного вида стресса или регулируют конкретную восприимчивость конкретного белка. Другие вспомогательные вещества оказывают более общее влияние на физическую и ковалентную стабильность белков.

Распространенные вспомогательные вещества, применяемые в жидких и лиофилизированных белковых составах, представлены в табл. 2 (см. Kamerzell et al. (2011), *Advanced Drug Delivery Rev.* 63(13): 1118-59).

Вспомогательные компоненты в белковых составах

Вспомогательный компонент	Функция	Примеры
Буферные вещества	Поддержание pH раствора Специфические взаимодействия ионов буферных веществ с белком	Цитрат Сукцинат Ацетат Глутамат Аспарат Гистидин Фосфат Трис Глицин
Сахара и углеводы	Стабилизация белка Средства, регулирующие тоничность Носитель для ингаляционных лекарственных средств (лактоза) Растворы декстрозы, применяемые при IV введении	Сахароза Трегалоза Сорбит Маннит Глюкоза Лактоза Производные циклодекстрина

Стабилизаторы и объемообразующие средства	Улучшение внешнего вида продукта и предотвращение утечки Обеспечение структурной прочности лиофилизированной лепешки	Маннит Глицин
Осмолиты	Стабилизация от стресса, обусловленного воздействием окружающей среды (температуры, потери влаги)	Сахароза Трегалоза Сорбит Глицин Пролин Глутамат Глицерол Мочевина
Аминокислоты	Специфические взаимодействия с белком Антиоксидант (His, Met) Буферизация, регуляция тоничности	Гистидин Аргинин Глицин Пролин Лизин Метионин Смеси Аа (например, Glu/Arg)
Белки и полимеры	Конкурентные ингибиторы адсорбции белка Объемообразующие средства для лиофилизации Средства-носители для доставки лекарственных средств	HSA PVA PVP PLGA PEG Желатин Декстран Гидроксиэтилкрахмал HEC CMC
Антиоксиданты	Предотвращение окислительного повреждения белка Средства, связывающие ионы металлов (если металл включен в	Восстановители Средства захвата растворенного кислорода

	качестве кофактора или требуется для протеазной активности) Средства захвата свободных радикалов	Средства захвата свободных радикалов Хелатообразующие средства (например, EDTA, EGTA, DTPA) Этанол
Ионы металлов	Кофакторы белков Координационные комплексы (суспензии)	Магний Цинк
Специфические лиганды	Стабилизаторы нативной конформации от разворачивания, индуцированного стрессом Обеспечение конформационной гибкости	Металлы Лиганды Аминокислоты Полианионы
Поверхностно-активные вещества	Конкурентный ингибитор адсорбции белка Конкурентный ингибитор поверхностной денатурации белка Липосомы как средства-носители для доставки лекарственных средств Ингибитор агрегации во время лиофилизации Средство, снижающее время восстановления лиофилизированных продуктов	Полисорбат 20 Полисорбат 80 Полоксамер 188 Анионные поверхностно-активные вещества (например, сульфаты и сульфосукцинаты) Катионные поверхностно-активные вещества Цвиттерионные поверхностно-активные вещества
Соли	Средства, регулирующие тоничность Стабилизирующие или дестабилизирующие средства для белков, в частности, анионы	NaCl KCl NaSO ₄
Консерванты	Защита от роста микроорганизмов в составе	Бензиловый спирт М-крезол Фенол

Другие вспомогательные вещества известны из уровня техники и могут быть найдены в Powell et al. (1998), "Compendium of Excipients for Parenteral Formulations," PDA J. Pharm. Sci. Tech., 52:238-311, который включен в данный документ посредством ссылки.

С учетом идей и указаний, приведенных в данном документе, специалисты в данной области будут знать, какое количество или диапазон количества вспомогательного вещества можно включать в любой

конкретный состав для получения биофармацевтического состава по настоящему изобретению. Например, количество и тип соли, которая должна быть включена в биофармацевтический состав по настоящему изобретению, можно выбрать, исходя из желаемой осмоляльности (т.е. изотоничности, гипотоничности или гипертоничности) конечного раствора, а также количеств и осмоляльности других компонентов, которые должны быть включены в состав. Аналогичным образом, в качестве примера со ссылкой на тип полиола или сахара, включенного в состав, количество такого вспомогательного вещества будет зависеть от его осмоляльности.

Специалисты в данной области могут определить, какое количество или диапазон количества вспомогательного вещества, которое способствует сохранению стабильности биофармацевтического препарата, можно включать в любой конкретный состав для получения биофармацевтического состава по настоящему изобретению. Например, количество и тип соли, которая должна быть включена в биофармацевтический состав по настоящему изобретению, можно выбрать, исходя из желаемой осмоляльности (т.е. изотоничности, гипотоничности или гипертоничности) конечного раствора, а также количеств и осмоляльности других компонентов, которые должны быть включены в состав. Аналогичным образом, в качестве примера со ссылкой на тип полиола или сахара, включенного в состав, количество такого вспомогательного вещества будет зависеть от его осмоляльности.

Приблизительно 5% вес./об. сорбита, например, может обеспечивать достижение изотоничности, тогда как вспомогательного вещества сахарозы для достижения изотоничности необходимо приблизительно 9% вес./об.. Выбор количества или диапазона концентраций одного или нескольких вспомогательных веществ, которые можно включать в биофармацевтический состав по настоящему изобретению, был пояснен на примере выше посредством ссылки на соли, полиолы и сахара. Однако, специалистам в данной области будет понятно, что соображения, описанные в данном документе и дополнительно поясненные на примере посредством ссылки на конкретные вспомогательные вещества, в равной степени применимы ко всем типам и комбинациям вспомогательных веществ, включая, например, соли, аминокислоты, другие средства, регулирующие тоничность, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы, объемобразующие средства, криопротекторы, лиопротекторы, антиоксиданты, ионы металлов, хелатообразующие средства и/или консерванты.

Кроме того, если конкретное вспомогательное вещество указано в составе посредством, например, процентного содержания (%) вес/объем, специалистам в данной области будет понятно, что также рассматривается эквивалентная молярная концентрация этого вспомогательного вещества.

Средним специалистам в данной области будет понятно, что концентрации вышеуказанных вспомогательных веществ обладают взаимозависимостью в конкретном составе. В качестве примера, концентрацию объемобразующего средства можно снизить в случае, например, наличия высокой концентрации белка/пептида или высокой концентрации стабилизирующего средства. Кроме того, среднему специалисту в данной области будет понятно, что в целях поддержания изотоничности конкретного состава, в котором отсутствует объемобразующее средство, концентрация стабилизирующего средства может быть соответствующим образом скорректирована (т.е. может использоваться количество стабилизатора, "регулирующее тоничность").

Буферные вещества

pH раствора оказывает влияние на химическую целостность аминокислотных остатков белка (например, дезамидирование Asn и окисление Met) и поддержание его структуры высшего порядка. Таким образом, специалисты в данной области применяют буферные средства для контроля pH раствора и оптимизации стабильности белка. Максимальная стабильность белкового лекарственного средства обычно находится в пределах узкого диапазона pH. Несколько подходов (например, исследования стабильности методом "ускоренного старения" и калориметрические скрининговые исследования) являются применимыми для этой цели (Remmele et al. (1999), *Biochemistry*, 38(16): 5241-7). После окончательной разработки состава лекарственный препарат следует изготавливать и поддерживать в рамках предварительно определенной спецификации на протяжении всего его срока годности при хранении. Следовательно, буферные средства почти всегда используют для контроля pH в составе.

Органические кислоты, фосфаты и Трис обычно используют в качестве буферных веществ в белковых составах (см. табл. 3). Буферная емкость буферных соединений является максимальной при pH, равном pK_a, и уменьшается по мере увеличения или уменьшения pH относительно данного значения. Девяносто процентов буферной емкости находится в пределах одной единицы pH от их pK_a. Буферная емкость также увеличивается пропорционально увеличению концентрации буферного вещества.

Широко применяемые буферные средства и их значения pK_a

Буферное вещество	pK_a	Иллюстративный лекарственный препарат
Ацетат	4,8	Neupogen®, Neulasta®
Сукцинат	$pK_{a1}=4,8$, $pK_{a2}=5,5$	Actimmune®
Цитрат	$pK_{a1}=3,1$, $pK_{a2}=4,8$, $pK_{a3}=6,4$	Humira®
Гистидин (имидазол)	6,0	Xolair®
Фосфат	$pK_{a1}=2,15$, $pK_{a2}=7,2$, $pK_{a3}=12,3$	Enbrel® (жидкий состав)
Трис	8,1	Leukine®

В дополнение к вышеуказанному, некоторые терапевтические белки могут быть самобуферизирующимися при фармацевтически значимой концентрации. В составах на основе таких белков может вообще не быть необходимым включение традиционного буфера. См. заявку на патент США 2012/0028877, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Сахара и углеводы

Сахара часто применяют для стабилизации белков как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Считается, что дисахариды, такие как сахароза и трегалоза, стабилизируют белки посредством преимущественной гидратации при высоких концентрациях в жидком состоянии, а также посредством специфических взаимодействий с белками и образования вязких стеклообразных матриц в твердом состоянии. Молекулы Сахаров могут увеличивать вязкость растворов моноклональных антител, по-видимому, посредством механизма преимущественной гидратации. Сахароспирты, такие как сорбит, могут стабилизировать белки в растворе и в лиофилизированном состоянии. Маннит часто применяют в качестве объемобразующего средства в лиофилизированных составах. Лактозу применяют в качестве молекулы-носителя для ингаляционных составов на основе белков. Производные циклодекстрина могут стабилизировать белки в жидких составах на основе антител, вакцинных антигенов и таких меньших белков, как факторы роста, интерлейкин-2 и инсулин. Стабилизаторы и объемобразующие средства.

Объемобразующее средства, как правило, применяют в лиофилизированных составах для улучшения внешнего вида продукта и предотвращения утечки. Условия в составе обычно разрабатывают таким образом, чтобы объемобразующее средство выкристаллизовывалось из замороженной аморфной фазы (во время замораживания либо отжига при температуре выше T_g), придавая лепешке структуру и объем. Маннит и глицин являются примерами широко применяемых объемобразующих средств.

Стабилизаторы включают класс соединений, которые могут служить в качестве криопротекторов, лиопротекторов и стеклообразующих средств. Действие криопротекторов заключается в стабилизации белков во время замораживания или в замороженном состоянии при низких температурах (P. Camegon, ed., Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice, Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, IL, (1997)). Леопротекторы стабилизируют белки в виде твердой дозированной формы, высушенной посредством сублимации, путем сохранения конформационных свойств белка, подобных нативным, во время стадий дегидратации при сублимационной сушке. Свойства в стеклообразном состоянии были классифицированы как "прочность" или "хрупкость" в зависимости от соответствующих релаксационных свойств, которые зависят от температуры. Важно, чтобы криопротекторы, лиопротекторы и стеклообразующие средства оставались в той же фазе, что и белок, с целью придания стабильности. Сахара, полимеры и полиолы относятся к этой категории и могут иногда играть все три роли.

Полиолы охватывают класс вспомогательных веществ, который включает сахара (например, маннит, сахарозу, сорбит) и другие многоатомные спирты (например, глицерин и пропиленгликоль). Полимер полиэтиленгликоль (PEG) включен в эту категорию. Полиолы обычно применяют в качестве стабилизирующих вспомогательных веществ и/или изотонических средств как в жидких, так и в лиофилизированных белковых составах для парентерального введения. Применительно к ряду Гофмейстера полиолы являются космотропными и преимущественно вытесняются с поверхности белков. Полиолы могут защищать белки как от физических, так и от химических путей разрушения. Преимущественно вытесняемые сорастворители увеличивают эффективное поверхностное натяжение растворителя на границе раздела с белком, в силу чего большинство энергетически выгодных конформаций белка представляют собой конформации с наименьшими площадями поверхности.

Маннит представляет собой объемобразующее средство, часто используемое в лиофилизированных составах, поскольку он выкристаллизовывается из аморфной фазы белка во время сублимационной сушки, придавая лепешке структурную стабильность (например, Leukine®, Enbrel® Lyo, Betaseron®). Его обычно применяют в комбинации с крио- и/или лиопротектором, таким как сахароза. Из-за склонности маннита к кристаллизации в замороженном состоянии сорбит и сахароза являются предпочтительными средствами, регулирующими тоничность/стабилизаторами в жидких составах для защиты продукта от видов стресса, обусловленных замораживанием-размораживанием, возникающих во время транспортировки или при замораживании нерасфасованного продукта перед изготовлением. Сорбит и сахароза являются гораздо более устойчивыми к кристаллизации и, следовательно, с меньшей вероятностью отделяются от белка в результате разделения фаз. Интересно отметить, что, хотя маннит применяли в количествах, регулирующих тоничность, в нескольких представленных на рынке жидких составах, таких как Actimmune®, Forteo® и Rebif®, этикетки продуктов таких лекарственных средств содержат предупреждение "не замораживать". Применения восстанавливающих Сахаров (содержащих свободные альдегидные или кетонные группы), таких как глюкоза и лактоза, необходимо избегать, так как они могут реагировать с поверхностными лизиновыми и аргининовыми остатками белков и гликировать их посредством реакции Майяра между альдегидными группами и первичными аминогруппами (Chevalier F, et al., *Nahrung*, 46(2): 58-63 (2002); Humeny A, et al., *J Agric Food Chem.* 50(7): 2153-60 (2002)). Сахароза может гидролизиться до фруктозы и глюкозы в кислых условиях (Kautz C. F. and Robinson A. L., *JACS*, 50(4) 1022-30 (1928)) и, следовательно, может вызывать гликирование.

В конкретных вариантах осуществления композиций по настоящему изобретению стабилизатор (или комбинацию стабилизаторов) добавляют к лиофилизированному составу для предотвращения или снижения агрегации и химического разрушения, вызванных лиофилизацией или вызванных хранением. Опалесцирующий или мутный раствор после восстановления указывает на то, что произошло осаждение белка. Термин "стабилизатор" означает вспомогательное вещество, способное к предотвращению агрегации или другого физического разрушения, а также химического разрушения (например, автолиза, дезамидирования, окисления и т. д.) в водном и твердом состояниях. Стабилизаторы, которые традиционно используют в фармацевтических композициях, включают без ограничения сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, раффинозу, целлобиозу, генциобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннит, сорбит, глицин, аргинин-HCl, полигидроксисоединения, в том числе полисахариды, такие как декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, циклодекстрины, N-метилпирролидон, целлюлоза и гиалуриновая кислота, хлорид натрия, Carpenter et al. (1991), *Develop. Biol. Standard* 74:225.

Осмолиты

Осмолиты, в настоящее время применяемые в качестве вспомогательных веществ в белковых составах, перечислены в табл. 2. Другие осмолиты, обычно встречающиеся в природе, которые могут быть применимыми в качестве вспомогательных веществ, включают таурин, бетаин, триметиламин-N-оксид (ТМАО), холин-O-сульфат и саркозин.

Белки и полимеры

Белковые вспомогательные вещества усложняют составление, особенно в том, что касается разработки аналитических способов отслеживания стабильности белковых лекарственных средства или вакцины в присутствии белкового вспомогательного вещества. Полимеры оценивались в качестве вспомогательных веществ (например, в качестве объемобразующих средств) в лиофилизированных белковых составах. Изучаются составы на основе белковых лекарственных средств и вакцин с контролируемым высвобождением, в которых белки составлены с полимерами, такими как сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) и полиэтиленгликоль (PEG). Множество дополнительных водорастворимых полимеров (например, гидроксиэтилцеллюлоза (HEC), карбоксиметилцеллюлоза (СМС)) использовались для получения составов на основе белковых лекарственных средств для местного применения.

PEG может стабилизировать белки посредством двух различных температурозависимых механизмов. При более низких температурах он преимущественно вытесняется с поверхности белка, но было показано, что он взаимодействует с развернутой формой белка при более высокой температуре благодаря своей амфипатической природе (Lee and Lee (1987), *Biochemistry*, 26(24): 7813-9). Он может защищать белки посредством преимущественного вытеснения при более низких температурах, но, возможно, и посредством снижения количества продуктивных столкновений между развернутыми молекулами при более высоких температурах. PEG также является криопротектором и использовался в Recombinate®, лиофилизированном составе на основе рекомбинантного антигемофильного фактора.

Антиоксиданты

Многие различные источники могут окислять остатки в белках. Окислительное повреждение белка можно свести к минимуму посредством тщательного контроля процесса изготовления и хранения продукта, в том числе таких факторов, как атмосферный кислород, температура, воздействие света и химическое загрязнение. Если такие способы контроля являются неприемлемыми, в состав можно включать вспомогательные вещества из группы антиоксидантов.

Наиболее широко применяемыми фармацевтическими вспомогательными веществами из группы

антиоксидантов являются восстановители, средства захвата растворенного кислорода/свободных радикалов или хелатообразующие средства. Антиоксиданты в составах на основе терапевтических белков должны быть водорастворимыми и должны оставаться активными на протяжении всего срока годности продукта при хранении. Восстановители и средства захвата растворенного кислорода/свободных радикалов действуют посредством удаления активных форм кислорода из раствора. Хелатообразующие средства (например, EDTA) могут быть эффективными, связывая следовые количества загрязняющих веществ, представляющих собой ионы металлов, которые способствуют образованию свободных радикалов. Например, в жидком составе на основе кислотного фактора роста фибробластов EDTA ингибирует окисление цистеиновых остатков, катализируемое ионами металлов. EDTA применялся в представленных на рынке продуктах, таких как Kineret® и Ontak®.

Ионы металлов

В целом, ионы переходных металлов являются нежелательными в белковых составах, поскольку они могут катализировать реакции физического и химического разрушения белков. Однако, специфические ионы металлов включают в составы, если они действуют в качестве кофакторов для белков. Ионы металлов можно также применять в суспензионных составах на основе белков, где они образуют координационные комплексы (например, в цинковой суспензии инсулина). Применение ионов магния (10-120 мМ) было предложено для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты (WO 2004/039337).

Было обнаружено, что ионы металлов придают стабильность и/или увеличенную активность в составе на основе человеческой дезоксирибонуклеазы (rhDNase, Pulmozyme®). Ионы Ca^{+2} (не более 100 мМ) увеличивают стабильность фермента посредством специфического связывающего участка (Chen et al. (1999), J Pharm Sci. 88(4): 477-82). В действительности удаление ионов кальция из раствора с EGTA вызывало увеличение дезамидирования и агрегации. Однако, этот эффект наблюдался только с ионами Ca^{+2} ; наблюдалось, что другие двухвалентные катионы - Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} - дестабилизируют rhDNase.

Аналогичные эффекты наблюдались в составе на основе фактора свертывания крови VIII. Ионы Ca^{+2} и Sr^{+2} стабилизируют белок, тогда как другие, такие как Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} дестабилизируют его (Fatouros, et al. (1997), Int. J. Pharm., 155, 121-131). В отдельном исследовании с фактором свертывания крови VIII в присутствии ионов Al^{+3} наблюдалось значительное увеличение скорости агрегации (Dergick et al. (2004), J. Pharm. Sci., 93(10): 2549-57). Авторы отмечают, что другие вспомогательные вещества, такие как буферные соли, часто загрязнены ионами Al^{+3} , и иллюстрируют необходимость применения вспомогательных веществ надлежащего качества в составляемых продуктах. Вакцины, содержащие живые или убитые аттенуированные пикорнавирусы, такие как вирусы гепатита А и полиомиелита, конформационно стабилизируют с помощью магния. Ионы металлов, таких как кальций, магний и цинк, улучшают стабильность окситоцина в водном растворе. Инсулин может связываться с цинком, что приводит к образованию димеров и гексамеров в кристаллической форме, что позволяет получать различные составы с различными профилями высвобождения *in vivo*. Химическая и термическая стабильность состава на основе гексамерного инсулина варьируется в присутствии различных уровней цинка и фенола.

Специфические лиганды

Один из подходов к улучшению конформационной стабильности белковых терапевтических лекарственных средств заключается в извлечении преимуществ из наличия лигандсвязывающих участков, свойственных для белка. Например, Pulmozyme® не только требует наличия двухвалентных ионов металлов для осуществления своей ферментативной активности, а и обладает улучшенной конформационной стабильностью в присутствии ионов кальция. Как кислотный, так и основной факторы роста фибробластов (aFGF и bFGF) оценивались в клиническом аспекте в отношении их способности содействовать заживлению ран, и оба белка в естественных условиях связываются с протеогликанами с высоким отрицательным зарядом на клеточных поверхностях. Разнообразные другие соединения с высоким отрицательным зарядом также связываются с aFGF и существенно стабилизируют его посредством взаимодействия с участком связывания полианионов в белке.

Поверхностно-активные вещества

Молекулы белков имеют высокую склонность к взаимодействию с поверхностями, что делает их восприимчивыми к адсорбции и денатурации на границах раздела фаз воздух-жидкость, флакон-жидкость и жидкость-жидкость (силиконовое масло). Этот путь разрушения находится в обратной зависимости от концентрации белка и приводит к образованию растворимых или нерастворимых белковых агрегатов или к потере белка из раствора посредством адсорбции на поверхностях. В дополнение к адсорбции на поверхности контейнера, поверхностно-индуцированное разрушение усиливается при физическом встряхивании, которое будет происходить во время перевозки и обращения.

Поверхностно-активные вещества обычно применяют в белковых составах для предотвращения поверхностно-индуцированного разрушения. Поверхностно-активные вещества представляют собой амфипатические молекулы, обладающие способностью оттеснять белки от положений на границах раздела фаз. Гидрофобные части молекул поверхностно-активных веществ занимают положения на границах раздела фаз (например, воздух/жидкость), тогда как гидрофильные части молекул остаются ориентиро-

ванными к объему растворителя. При достаточных концентрациях (как правило, около критической мицеллярной концентрации детергента) поверхностный слой молекул поверхностно-активных веществ служит для предотвращения адсорбции молекул белков на границе раздела фаз. Таким образом поверхностно-индуцированное разрушение сводится к минимуму.

Наиболее широко применяемыми поверхностно-активными веществами являются неионогенные полиэтокселированные сложные эфиры сорбитана и жирных кислот, т.е. полисорбат 20 и полисорбат 80 (например, в лекарственных препаратах Avonex®, Neupogen®, Neulasta®). Эти две молекулы отличаются только длиной алифатической цепи, которая придает гидрофобный характер молекулам, соответственно C-12 и C-18. Полисорбат 80 является более поверхностно-активным и имеет более низкую критическую мицеллярную концентрацию, чем полисорбат 20. Было показано, что как полисорбат 20, так и полисорбат 80 обеспечивают защиту от агрегации, индуцированной встряхиванием. Полисорбат 20 и полисорбат 80 также обеспечивают защиту от стресса, индуцированного замораживанием, лиофилизацией и восстановлением. Как полисорбат 20, так и полисорбат 80 могут содержать пероксиды, которые могут окислять белки, и они сами могут разрушаться посредством окисления либо гидролиза, оказывая различные эффекты в отношении стабильности белков. Также может быть трудно контролировать уровень полисорбата 20 или полисорбата 80 в составах из-за их сложного поведения во время мембранной фильтрации (особенно при концентрациях, при которых полисорбаты образуют мицеллы в растворе). Поверхностно-активное вещество полоксамер 188 также применялось в нескольких представленных на рынке жидких продуктах, таких как Gonal-F®, Norditropin® и Ovidrel®. В целом считается, что неионогенные поверхностно-активные вещества стабилизируют белки в основном посредством оттеснения молекул белков от гидрофобных поверхностей (например, границ раздела фаз воздух-вода), тем самым предотвращая разворачивание белков на этих гидрофобных границах раздела фаз. Неионогенные поверхностно-активные вещества могут также блокировать адсорбцию молекул белков на других гидрофобных поверхностях, присутствующих во время обработки. Кроме того, неионогенные поверхностно-активные вещества могут непосредственно взаимодействовать с гидрофобными областями молекул белков. Моноклональные антитела могут оказывать влияние на критическую мицеллярную концентрацию полисорбата 20 по сравнению с буфером в отдельности.

Детергенты могут также оказывать влияние на термодинамическую конформационную стабильность белков. И в этом случае эффекты данного вспомогательного вещества будут специфичными для белка. Например, было показано, что полисорбаты снижают стабильность некоторых белков и увеличивают стабильность других белков. Дестабилизации белков детергентами можно дать рациональное объяснение в контексте гидрофобных хвостов молекул детергентов, которые могут участвовать в специфическом связывании с белками в частично или полностью развернутом состоянии. Такие типы взаимодействий могут вызывать сдвиг конформационного равновесия в сторону более развернутых состояний белка (т.е. увеличение доступности гидрофобных частей молекулы белка в дополнение к связыванию полисорбата). В качестве альтернативы, если белок в нативном состоянии имеет некоторые гидрофобные поверхности, связывание детергента с белком в нативном состоянии может стабилизировать эту конформацию.

Другой аспект полисорбатов заключается в том, что они по своей природе являются восприимчивыми к окислительному разрушению. Часто в качестве исходных материалов они содержат достаточные количества пероксидов для того, чтобы вызвать окисление боковых цепей остатков в белках, в частности, метионина. Потенциальная возможность окислительного повреждения вследствие добавления стабилизатора подчеркивает тот факт, что в составах необходимо использовать наиболее низкие эффективные концентрации вспомогательных веществ. Для поверхностно-активных веществ эффективная концентрация данного белка будет зависеть от механизма стабилизации. Было высказано предположение, что если механизм стабилизации с помощью поверхностно-активного вещества связан с предотвращением поверхностной денатурации, то эффективная концентрация будет находиться около критической мицеллярной концентрации детергента. Если же механизм стабилизации связан со специфическими взаимодействиями белка и детергента, то эффективная концентрация поверхностно-активного вещества будет связана с концентрацией белка и стехиометрией взаимодействия (Randolph et al. (2002), *Pharm Biotechnol.*, 13:159-75).

Поверхностно-активные вещества можно также добавлять в соответствующих количествах для предотвращения поверхностной агрегации во время замораживания и высушивания (Chang (1996), *J. Pharm. Sci.* 85:1325). Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают анионные, катионные, неионогенные, цвиттерионные и амфотерные поверхностно-активные вещества, в том числе поверхностно-активные вещества, полученные из встречающихся в природе аминокислот. Анионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия, хенодезоксихолевою кислоту, натриевую соль N-лауроилсаркозина, додецилсульфат лития, натриевую соль 1-октансульфоновою кислоты, гидрат холата натрия, дезоксихолат натрия и натриевую соль гликодезоксихолевою кислоты. Катионные поверхностно-активные вещества включают без ограничения хлорид бензалкония или хлорид бензетония, моногидрат хлорида цетилпиридиния и бромид гексадецилтриметиламмония. Цвиттерионные поверхностно-

активные вещества включают без ограничения CHAPS, CHAPSO, SB3-10 и SB3-12. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают без ограничения дигитонин, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 и TWEEN-80. В другом варианте осуществления поверхностно-активные вещества включают лаурмакрогол 400, полиоксил-40-стеарат, полиоксиэтилен-10, -40, -50 и -60-гидрогенизированное касторовое масло, моностеарат глицерина, полисорбат 40, 60, 65 и 80, соевый лецитин и другие фосфолипиды, такие как DOPC, DMPG, DMPC и DOPG; сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу.

Соли

Соли часто добавляют для увеличения ионной силы состава, которая может быть важна для растворимости, физической стабильности и изотоничности белка. Соли могут оказывать влияние на физическую стабильность белков разнообразными способами. Ионы могут стабилизировать нативное состояние белков посредством связывания с заряженными остатками на поверхности белка. В качестве альтернативы, они могут стабилизировать денатурированное состояние посредством связывания с пептидными группами вдоль остова белка (-CONH-). Соли могут также стабилизировать нативную конформацию белка посредством экранирования отталкивающих электростатических взаимодействий между остатками в молекуле белка. Электролиты в белковых составах также могут экранировать притягивающие электростатические взаимодействия между молекулами белков, что может приводить к агрегации и нерастворимости белков.

Эффект соли в отношении стабильности и растворимости белков в значительной степени варьируется в зависимости от характеристик видов ионов. Ряд Гофмейстера появился в 1880-х годах как способ ранжирования электролитов по порядку на основе их способности к осаждению белков (Casace et al. (1997), *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(3): 241-277). В этом сообщении ряд Гофмейстера используют для иллюстрации размаха эффектов стабилизации белков с помощью ионогенных и неионогенных соразтворенных веществ. В таблице С соразтворенные вещества упорядочены по их общим эффектам в отношении состояния белков в растворе от стабилизирующих (космотропных) до дестабилизирующих (хаотропных). В целом, различия в эффектах среди анионов являются намного большими, чем различия в эффектах, наблюдаемые для катионов, и для обоих типов эффекты являются наиболее очевидными при более высоких концентрациях, чем допустимые в составах для парентерального введения. Высокие концентрации космотропов (например, >1 моль/л сульфата аммония) обычно используют для осаждения белков из раствора с помощью процесса, называемого "высаливанием", где космотроп преимущественно вытесняется с поверхности белка, снижая растворимость белка в его нативной (свернутой) конформации. Удаление или разбавление соли вернет белок в раствор. Термин "всаливание" относится к применению дестабилизирующих ионов (например, таких как гуанидин и хлорид), которые увеличивают растворимость белков посредством сольватации пептидных связей в остове белка. Увеличение концентраций хаотропа будет способствовать конформации белка в денатурированном (развернутом) состоянии, поскольку увеличивается растворимость пептидной цепи. Относительная эффективность ионов в отношении "всаливания" и "высаливания" определяет их положение в ряду Гофмейстера.

Ряд Гофмейстера для солей

Сорастворенное вещество			Размах стабилизации	
Анион	Катион	Другие		
F ⁻	(CH ₃) ₄ N ⁺	Глицерин/сорбит	Стабилизация <i>(высаливание)</i>	<i>Космотропный</i>
PO ₄ ⁻	(CH ₃) ₂ NH ⁺	Сахароза/трегалоза		
SO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	ТМАО		
CHCOO ⁻	K ⁺			
Cl ⁻	Na ⁺			
Br ⁻	Cs ⁺			
I ⁻	Li ⁺			
	Mg ²⁺	Гуанидин		
	Ca ²⁺	Аргинин		
	Ba ²⁺	Мочевина		
			<i>Дестабилизация</i> <i>(всаливание)</i>	<i>Хаотропный</i>

Для поддержания изотоничности в составе для парентерального введения концентрации солей обычно ограничены величиной менее чем 150 мМ для комбинаций одновалентных ионов. В этом диапазоне концентраций механизм стабилизации с помощью солей, вероятно, обусловлен экранированием электростатических отталкивающих внутримолекулярных сил или притягивающих межмолекулярных сил (экранированием Дебая-Хюккеля). Интересно, что, как было показано, хаотропные соли являются более эффективными, чем космотропы в аналогичных концентрациях, при стабилизации структуры белка по этому механизму. Считается, что хаотропные анионы связываются более прочно, чем космотропные ионы. Что касается разрушения ковалентных связей в белках, в соответствии с теорией Дебая-Хюккеля ожидаются дифференциальные эффекты ионной силы в отношении этого механизма. Соответственно, опубликованные сообщения о стабилизации белков с помощью хлорида натрия сопровождаются сообщениями, в которых хлорид натрия ускорял разрушение ковалентных связей. Механизмы, посредством которых соли оказывают влияние на стабильность белков, являются специфичными для белка и могут в значительной степени варьироваться в зависимости от pH раствора. Примером, где вспомогательное вещество может быть применимым для обеспечения доставки белкового лекарственного средства, является пример некоторых высококонцентрированных составов на основе антител. В последние несколько лет было показано, что соли являются эффективными в снижении вязкости таких составов (Liu et al. (2005, 2006), J. Pharm. Sci., 94(9): 1928-40, исправление в J Pharm Sci., 95(1): 234-5).

Консерванты

Консерванты необходимы для разработки многодозовых составов для парентерального введения, которые предусматривают более одного извлечения из одного и того же контейнера. Их основная функция заключается в ингибировании роста микроорганизмов и обеспечении стерильности продукта на протяжении всего срока годности при хранения или срока применения лекарственного препарата. Широко применяемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения, разработка белковых составов, которые содержат консерванты, может быть сложной задачей. Консерванты почти всегда оказывают дестабилизирующий эффект в отношении белков (агрегация), и это стало основным фактором ограничения их применения в многодозовых белковых составах (Roy et al. (2005), J. Pharm. Sci., 94(2): 382-96). Было показано, что бензиловый спирт также оказывает влияние на структуру и стабильность белков в зависимости от концентрации, температуры и времени. Из-за этих дестабилизирующих эффектов множество лиофилизированных белковых составов восстанавливают с помощью разбавителя, содержащего бензиловый спирт, для сведения к минимуму времени контакта с белком до введения.

Большинство белковых лекарственных средств составлялись только для однократного применения. Однако, если возможно получить многодозовые составы, они имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении удобства для пациентов и увеличении рыночной привлекательности. Хорошим примером является гормон роста человека (hGH), в случае с которым разработка составов с до-

бавлением консервантов привела к появлению на рынке более удобных форм выпуска в виде многодозовых инъекционных ручек. В настоящее время доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде ручек, содержащих составы на основе hGH с добавлением консервантов. Norditropin® (жидкий), Nutropin AQ® (жидкий) и Genotropin (лиофилизированный - двухкамерный картридж) содержат фенол, тогда как Somatrop® составлен с м-крезолом.

При разработке составов для получения дозированных форм с добавлением консервантов необходимо рассматривать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном препарате должна быть оптимизирована. Для этого необходимо провести тестирование данного консерванта в дозированной форме в диапазонах концентраций, которые обеспечивают противомикробную эффективность без нарушения стабильности белка. Например, три консерванта были успешно подвергнуты скринингу во время разработки жидкого состава для рецептора интерлейкина 1 (I типа) с применением дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). Консерванты ранжировали по порядку, исходя из их влияния на стабильность при концентрациях, обычно используемых в представленных на рынке продуктах (Remmele et al. (1998), *Pharm. Res.*, 15(2): 200-8).

Как и предполагалось, разработка жидких составов, содержащих консерванты, является более сложной задачей, чем разработка лиофилизированных составов. Высушенные посредством сублимации продукты можно лиофилизировать без консерванта и восстанавливать с помощью разбавителя, содержащего консервант, в момент применения. Это сокращает время, в течение которого консервант контактирует с белком, таким образом значительно сводя к минимуму связанные с этим риски для стабильности. При применении жидких составов эффективность и стабильность консерванта должны поддерживаться в течение всего срока годности продукта при хранении (обычно приблизительно 18-24 месяцев). Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Некоторые консерванты могут вызывать реакции в месте инъекции, что является еще одним фактором, который необходимо рассматривать при выборе консерванта. В клинических испытаниях, направленных на оценивание консервантов и буферных веществ для Norditropin®, наблюдалось снижение восприятия боли при применении составов, содержащих фенол и бензиловый спирт, по сравнению с составом, содержащим м-крезол (Kappelgaard (2004), *Hum. Res.* 62 Suppl 3:98-103). Интересно, что среди широко применяемых консервантов бензиловый спирт обладает анестезирующими свойствами (Minogue and Sun (2005), *Anesth. Analg.* 100(3): 683-6).

Демонстрационные примеры

Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Следует понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретными описанными методологией, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Специалистам в данной области будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются приведенной ниже формулой изобретения.

Пример 1.

Этот эксперимент демонстрирует, что посредством корректировки целевых параметров заполняемой массы может быть получена точная целевая концентрация белка для соответствующего восстановленного лекарственного препарата.

Материалы.

Буфер, содержащий: маннит, сахарозу, L-гистидин, полисорбат 20 при pH 5.

Контейнер: флакон, объем 3 куб. см, с внутренней кольцевой канавкой на горлышке, стекло типа I, необработанный, венчик диаметром 13 мм с пробкой диаметром 13 мм, 4432/50 V-50.

Ромиплостим в виде отфильтрованного очищенного нерасфасованного продукта.

Способ.

1. Разбавляют лекарственное средство с получением целевого состава продукта (0,5 мг/мл) с использованием требуемого количества буфера для разбавления.

2. Фильтруют составленный раствор с помощью фильтра из поливинилидендифторида (PVDF) с диаметром пор 0,22 мкм.

3. Подготавливают флаконы и пробку: флаконы объемом 3 куб. см промывают и депирогенизируют.

4. Заполняют достаточное количество флаконов соответствующей целевой заполняемой массой: 0,307, 0,322, 0,342, 0,357, 0,373 г.

5. Частично закупоривают флаконы пробками и помещают в лиофилизатор.

6. Прогоняют требуемый цикл лиофилизации с надлежащим замораживанием, вакуумом, с первичным и вторичным высушиванием, с последующим закупориванием и выгрузкой лиофилизированного

продукта в герметизированных флаконах.

7. Восстанавливают продукт с помощью заданного объема для восстановления, составляющего 0,32 мл воды для инъекций.

8. Измеряют полученную концентрацию белка во флаконах с использованием поглощения ультрафиолетового излучения (UV). Коэффициент поглощения определяют как количество света определенной длины волны, которое поглощается при прохождении через аналит. Единица оптической плотности зависит от коэффициента собственного поглощения молекулы, ее концентрации и длины оптического пути аналита. Ароматические аминокислоты фенилаланин, тирозин и триптофан в молекулах белков поглощают свет в UV-диапазоне, составляющем 260-290 нм. Поглощение UV-излучения в этом диапазоне обычно используют для определения присутствия белка в растворе.

9. Измеряют осмоляльность продукта с использованием понижения точки замерзания.

10. Осуществляют анализ для определения эффекта скорректированных целевых параметров заполняемой массы как в отношении белка, так и в отношении осмоляльности.

Таблица 5

Краткое описание значений заполняемой массы и концентрации белка

Параметры эксперимента		Условия	А	В	С	Д	Е
Входной параметр	Концентрация в нерасфасованном составе (мг/мл)		0,528	0,528	0,528	0,528	0,528
	Среднее значение заполняемой массы (г)		0,307	0,322	0,342	0,357	0,373
Выходной параметр	Среднее значение концентрации белка после восстановления (мг/мл)		0,459	0,484	0,518	0,546	0,565

Наблюдалась сильная линейная взаимосвязь между концентрацией восстановленного белка и заполняемым объемом, о чем свидетельствует значение R^2 , составляющее 0,9964, как показано на фиг. 6. Эту линейную взаимосвязь можно объяснить теоретически с использованием массового баланса белка, как показано ниже:

$$C_{\text{восстановленный}} * V_{\text{восстановленный}} = (C_{\text{составленный}} - C_{\text{потеря}}) * V_{\text{заполняемый}} \quad [\text{уравнение 1}]$$

$$C_{\text{восстановленный}} = \frac{C_{\text{составленный}} - C_{\text{потеря}}}{V_{\text{восстановленный}}} * V_{\text{заполняемый}} \quad [\text{уравнение 2}]$$

где $C_{\text{восстановленный}}$ означает концентрацию белка после восстановления, $V_{\text{восстановленный}}$ означает объем продукта после восстановления, $C_{\text{составленный}}$ означает концентрацию белка в нерасфасованном составе, $C_{\text{потеря}}$ означает потерю белка вследствие связывания с фильтром и контейнерами, и $V_{\text{заполняемый}}$ означает заполняемый объем в каждом флаконе. Поскольку концентрация в нерасфасованном составе, потеря белка из-за связывания и объем для восстановления являются постоянными величинами в данном прогоне, концентрация белка после восстановления пропорциональна заполняемому объему, как указано в уравнении 2.

В эксперименте полупромышленного масштаба изменчивость концентрации белка в конечном восстановленном лекарственном препарате (DP) определяли с использованием 10 повторностей для каждого условия заполнения, как показано в табл. 6. Следовательно, наблюдаемая изменчивость представляет как изменчивость процесса, так и аналитическую изменчивость, в том числе изменчивость, связанную с восстановлением продукта.

Таблица 6

Изменчивость концентрации (восстановленного) белка при каждом условии заполнения

	A	B	C	D	E
	(-10%)	(-5%)	(Целевое значение)	(+5%)	(+10%)
Количество повторностей	10	10	10	10	10
Среднее значение (мг/мл)	0,459	0,484	0,518	0,546	0,565
Стандартное отклонение (SD, мг/мл)	0,0084	0,0133	0,0082	0,0052	0,0069
Относительное SD (%)	1,83	2,76	1,58	0,94	1,23

Влияние заполняемой массы на осмоляльность (восстановленного DP) Конечный лекарственный препарат после восстановления тестировали в отношении осмоляльности в заполненных флаконах при пяти целевых параметрах заполняемой массы. Результаты определения осмоляльности до заполнения и после восстановления обобщены в табл. 7. Согласно результатам при целевой заполняемой массе 0,341 г осмоляльность не изменяется после заполнения и восстановления, что указывает на то, что потеря вспомогательных веществ в заметных количествах не происходила. Осмоляльность незначительно увеличивается при более высоких заполняемых объемах и незначительно уменьшается при более низких заполняемых объемах, если объем для восстановления поддерживается постоянным.

Таблица 7

Краткое описание значений заполняемой массы и осмоляльности

Параметры		A	B	C	D	E
Входной параметр	Осмоляльность в нерасфасованном составе (мОсм/кг)*	312,4	312,4	312,4	312,4	312,4
	Среднее значение заполняемой массы (г)	0,307	0,322	0,342	0,357	0,373
	Среднее значение заполняемого объема (мл)	0,301	0,316	0,336	0,350	0,366
	Нормализованный объем (%)	89,9%	94,3%	100,2%	104,6%	109,3%

Выходной параметр	Эффективный объем после восстановления (мл)	0,335	0,335	0,335	0,335	0,335
	Среднее значение осмоляльности после восстановления (мОсм/кг)	280	294	313	327	342
	Нормализованное значение осмоляльности (%)	89,6%	94,0%	100,0%	104,6%	109,3%

Была обнаружена линейная взаимосвязь при построении графика зависимости осмоляльности продукта (нормализованной по целевой осмоляльности 313 мОсм/кг при целевой заполняемой массе) от заполняемой массы/объема (нормализованной по целевому значению 0,341 г), как показано на фиг. 7. Эту линейную взаимосвязь можно объяснить посредством определения осмоляльности и ее зависимости от концентрации компонентов буфера.

Осмоляльность является мерой концентрации растворенного вещества, определяемой как количество осмолей (Осм) растворенного вещества на килограмм растворителя (осмоль/кг или Осм/кг). В отличие от молярности (моль/л), по осмоляльности измеряют количество молей частиц растворенного вещества (таких как диссоциированный ион), а не количество молей растворенного вещества. Осмоляльность раствора можно рассчитать с помощью следующего выражения:

$$\text{Осмоляльность (Осм/кг)} = \text{плотность} * \sum \varphi_i n_i C_i \quad [\text{уравнение 3}];$$

где φ означает осмотический коэффициент, n означает количество частиц (например, ионов), на которые молекула диссоциирует, и C означает молярную концентрацию (моль/л) растворенного вещества.

В случае, когда заполняемая масса (или объем) на 10% превышает целевой объем, концентрация каждого вида вспомогательных веществ в составе увеличивается на 10% после восстановления до постоянного объема. Поскольку (φ_i и n_i являются постоянными величинами в известном составе, увеличение концентрации каждого вида вспомогательных веществ на 10% приводит к увеличению осмоляльности на 10%, как показано в уравнении 3. Аналогичным образом, уменьшение заполняемого объема на 10% приводит к уменьшению концентрации вспомогательных веществ на 10% и, следовательно, к уменьшению осмоляльности на 10%.

Пример 2.

Белок блинатумомаб в концентрации 55 мг/мл составляли с 200 мМ L-лизин-HCl, 25 мМ лимонной кислотой, 15% вес./об. дигидратом трегалозы, 0,1% вес./об. полисорбатом 80 при pH 7,0. Допустимый диапазон концентраций составленного белка определяли на стадии фильтрации нерасфасованного продукта. Использовали значения концентрации нерасфасованного продукта в диапазоне от 48,0 мг/мл до 65,0 мг/мл. Целевые значения заполняемой массы рассчитывали, исходя из измеренной концентрации белка, чтобы получить целевую концентрацию в восстановленном лекарственном препарате 12,5 мг/мл после восстановления с помощью 3 мл воды.

$$C_{\text{восстановленный}} * V_{\text{восстановленный}} = (C_{\text{составленный}} - C_{\text{потери}}) * V_{\text{заполняемый}}$$

где

$$C_{\text{восстановленный}} * V_{\text{восстановленный}} = \text{Целевое содержание белка}_{\text{восстановленный}}$$

Затем целевое содержание белка можно умножить на плотность продукта и разделить на измеренную концентрацию лекарственного средства (при необходимости скорректированную по потере вследствие связывания) для определения целевой заполняемой массы.

Целевую заполняемую массу рассчитывают в соответствии со следующей формулой с соответствующим диапазоном значений заполняемой массы 0,634-0,858 г.

$$\text{Заполняемая масса (г)} = \frac{\text{целевая доза (38,5 \frac{\text{мкг}}{\text{флакон}}) \times \text{плотность (1,07 \frac{\text{г}}{\text{мл}})}}{\text{концентрация DS (x \frac{\text{мкг}}{\text{мл}})}$$

где DS, как обычно понимают специалисты в данной области, относится к лекарственному веществу. В более общем изложении,

$$\text{скорректированная заполняемая масса} = \frac{(\text{целевая фиксированная доза терапевтического белка}) \times (\text{плотность})}{\text{концентрация терапевтического белка в нерасфасованном составе}}$$

Пример 3.

Лекарственный препарат на основе инфликсимаба с $20 \pm 1,5$ мг/мл инфликсимаба составляли с 10 мМ фосфатом натрия, 10% вес./об. сахарозой, 0,01% вес./об. полисорбатом 80, при pH 7,2 после восстановления с помощью 10 мл воды для инъекций.

Целевую заполняемую массу рассчитывают в соответствии со следующей формулой с соответствующим диапазоном значений заполняемой массы 4,85-5,63 г.

Расчет целевой заполняемой массы:

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка (100 мг)}) \times (\text{плотность (1,042 } \frac{\text{г}}{\text{мл}})})}{\text{концентрация белка в высвобождающемся лекарственном веществе (} \frac{\text{мг}}{\text{мл}})}$$

Пример 4.

Трастузумаб в концентрации 21 мг/мл составляли с 0,303 мг/мл L-гистидина, 0,470 мг/мл моногидрата гидрохлорида L-гистидина, 19,1 мг/мл дигидрата α, α -трегалозы, 0,0840 мг/мл полисорбата 20, при pH 6,1. Целевую заполняемую массу рассчитывают в соответствии с формулой, приведенной ниже, с варьирующимися диапазонами значений заполняемой массы согласно требованиям к доставке продукта. Целевые параметры заполняемой массы находятся в диапазоне 3,1-21,2 г (в зависимости от соответствующей формы выпуска). Этот продукт имеет множество форм выпуска с общей концентрацией лекарственного вещества 21 мг/мл.

Целевую заполняемую массу для каждой партии лекарственного препарата в данном примере 4 и последующих примерах рассчитывают с использованием следующей информации:

$$\text{Целевая заполняемая масса [г]} = \frac{(\text{целевое содержание белка [мг]}) \times (\text{плотность [г/мл]})}{\text{общая концентрация лекарственного вещества [мг/мл]}}$$

В качестве примера, целевая заполняемая масса для формы выпуска со 150 мг [г]

$$= \frac{(156 \text{ мг}) \times (1,01 \text{ г/мл})}{\text{общая концентрация лекарственного вещества [21 мг/мл]}}$$

В качестве другого примера, целевая заполняемая масса для формы выпуска с 420 мг [г]

$$= \frac{(440 \text{ мг}) \times (1,01 \text{ г/мл})}{\text{общая концентрация лекарственного вещества [21 мг/мл]}}$$

В качестве дополнительного примера, целевая заполняемая масса для формы выпуска с 60 мг [г]

$$= \frac{(65 \text{ мг}) \times (1,01 \text{ г/мл})}{\text{общая концентрация лекарственного вещества [21 мг/мл]}}$$

Пример 5.

AMG 701 представляет собой биспецифический активатор, привлекающий T-клетки (BiTE®), в виде конструкции на основе одноцепочечных вариабельных доменов антитела к ВСМА и антитела к CD3 (см. NCI Drug Dictionary и другие литературные источники). AMG 701 с концентрацией белка 1 мг/мл составляли с 10 мМ L-глутаминовой кислотой, 9,0% вес./об. сахарозой, 0,010% вес./об. полисорбатом 80, при pH 4,2. Целевую заполняемую массу рассчитывают в соответствии с формулой, приведенной ниже, с варьирующимися диапазонами значений заполняемой массы согласно требованиям к доставке продукта. AMG 701 имеет три формы выпуска с диапазоном целевых параметров заполняемой массы для первой формы выпуска 0,47-0,57 г, для второй формы выпуска 1,60-1,96 г и для третьей формы выпуска 3,28-4,01 г.

Для первой формы выпуска:

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка (0,50 мг)}) \times (\text{плотность (1,032 } \frac{\text{г}}{\text{мл}})})}{\text{концентрация белка в высвобождающемся лекарственном веществе (1,0 } \frac{\text{мг}}{\text{мл}})}$$

Для второй формы выпуска:

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка (1,71 мг)}) \times (\text{плотность (1,032 } \frac{\text{г}}{\text{мл}})})}{\text{концентрация белка в высвобождающемся лекарственном веществе (1,0 } \frac{\text{мг}}{\text{мл}})}$$

Для третьей формы выпуска:

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка (3,5 мг)}) \times (\text{плотность (1,032 } \frac{\text{г}}{\text{мл}})})}{\text{концентрация белка в высвобождающемся лекарственном веществе (1,0 } \frac{\text{мг}}{\text{мл}})}$$

Пример 6.

AMG 330 представляет собой биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки (BiTE®), в виде конструкции на основе одноцепочечных переменных доменов антитела к CD33 и антитела к CD3 (см. NCI Drug Dictionary и другие литературные источники). AMG 300 с концентрацией белка 0,5 мг/мл составляли с 10 мМ фосфатом калия, 8,0% вес./об. сахарозой, 1,0% вес./об. сульфобутиловым эфиром бета-циклодекстрина (SBE-CD), 0,010% вес./об. полисорбатом 80, при pH 6,1. Целевую заполняемую массу рассчитывают в соответствии с формулой, приведенной ниже, с варьирующимися диапазонами значений заполняемой массы согласно требованиям к доставке продукта. Целевые параметры заполняемой массы находятся в диапазоне 1,2-1,5 г. Целевую заполняемую массу рассчитывают следующим образом:

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка (0,64 мг)}) \times (\text{плотность (1,033 } \frac{\text{г}}{\text{мл}})})}{\text{концентрация белка в лекарственном веществе (0,5 } \frac{\text{мг}}{\text{мл}})}$$

В целом, методологию можно применять в случае, когда в контейнере требуется целевое количество продукта для обеспечения того, что продукт после восстановления будет иметь требуемую концентрацию. Этот результат достигается посредством определения величины объема восстановленного продукта; например, объем 1 мл с желаемой концентрацией терапевтического белка 1 мг/мл дает общую величину требуемого содержания белка 1 мг.

Целевое содержание белка [мг]=(концентрация белка [мг/мл]×объем после восстановления [мл])

Целевое содержание белка затем используют для расчета целевой заполняемой массы с использованием формулы, приведенной ниже. Внутрипроизводственную или измеряемую концентрацию лекарственного средства, как правило, измеряют в качестве части процесса составления для компенсации какой-либо варибельности процесса. В некоторых случаях осуществляют корректировку целевого содержания белка для компенсации потери продукта вследствие связывания. Требуется достоверность измерения концентрации лекарственного средства для обеспечения получения точных целевых значений заполняемой массы.

$$\text{Целевая заполняемая масса (г)} = \frac{(\text{целевое содержание белка [мг]}) \times (\text{плотность [г/мл]})}{\text{измеренная концентрация лекарственного вещества [мг/мл]}}$$

Это конкретный пример, поскольку в терапевтическом препарате как внутрипроизводственная концентрация, так и концентрация восстановленного продукта может находиться в диапазоне от нескольких микрограммов (мкг или микрогр.) на миллилитр (мл) до нескольких миллиграммов (мг) на миллилитр (мл).

Требуется проверка осмоляльности, как обсуждается выше (на основании экспериментальных результатов). Ограничения допустимой измеряемой концентрации лекарственного средства устанавливаются в комбинации с целевыми параметрами заполняемой массы для достижения заполнения контейнера требуемым количеством активного лекарственного средства для гарантирования того, что восстановленный продукт соответствует пределам требований спецификации как по концентрации продукта (активного лекарственного средства или белка), так и по осмоляльности.

Все публикации, патенты и патентные заявки, обсуждаемые и цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Следует понимать, что раскрытое изобретение не ограничивается конкретными описанными методологией, протоколами и материалами, так как они могут варьироваться. Кроме того, следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Специалистам в данной области будут понятны или они будут способны определить посредством проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты охватываются приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения лиофилизированного фармацевтического состава на основе терапевтического белка, который включает

- a) получение состава с нерасфасованным количеством терапевтического белка,
- b) измерение концентрации терапевтического белка в указанном нерасфасованном составе,

с) определение заполняемой массы указанного нерасфасованного состава в соответствии с формулой, представленной ниже, с получением целевой фиксированной дозы терапевтического белка в контейнере:

$$\text{заполняемая масса [г]} = \frac{(\text{целевая фиксированная доза терапевтического белка [мг]} \times (\text{плотность [г/мл]}))}{\text{концентрация терапевтического белка в нерасфасованном составе [мг/мл]}}$$

и

d) лиофилизацию состава в контейнере.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий восстановление лиофилизованного состава, где концентрация терапевтического белка в восстановленном составе является равной приблизительно 20 мг/мл или меньше.

3. Способ по п.1, в котором терапевтический белок выбран из ромиплостима, блинатумомаба, инфликсимаба, трастузумаба, AMG 701 и AMG 330.

4. Способ по п.1, в котором терапевтический белок представляет собой ромиплостим, и концентрация белка ромиплостима составляет приблизительно 0,5 мг/мл.

5. Способ по п.1, в котором восстановленный состав содержит приблизительно 0,5 мг/мл ромиплостима, приблизительно 10 мМ гистидина, приблизительно 4% вес./об. маннита, приблизительно 2% вес./об. сахарозы, приблизительно 0,004% полисорбата 20 и имеет рН, составляющий приблизительно 5,0.

6. Способ по п.2, в котором терапевтический белок представляет собой блинатумомаб, и концентрация белка блинатумомаба составляет приблизительно 55 мкг/мл.

7. Способ по п.6, в котором состав содержит приблизительно 55 мкг/мл блинатумомаба, приблизительно 25 мМ моногидрата лимонной кислоты, приблизительно 15% вес./об. трегалозы, приблизительно 200 мМ гидрохлорида L-лизина, приблизительно 0,1% вес./об. полисорбата 80 и имеет рН, составляющий приблизительно 7,0.

8. Способ по п.2, в котором терапевтический белок представляет собой инфликсимаб, и концентрация белка инфликсимаба составляет приблизительно $20 \pm 1,5$ мг/мл.

9. Способ по п.8, в котором восстановленный состав содержит приблизительно 20 мг/мл инфликсимаба, приблизительно 10 мМ фосфата натрия, приблизительно 10% вес./об. сахарозы и приблизительно 0,01% вес./об. полисорбата 80 и имеет рН, составляющий приблизительно 7,2.

10. Способ по п.2, в котором терапевтический белок представляет собой трастузумаб, и концентрация белка трастузумаба составляет приблизительно 21 мг/мл.

11. Способ по п.10, в котором восстановленный состав содержит приблизительно 21 мг/мл трастузумаба, приблизительно 0,303 мг/мл L-гистидина, приблизительно 0,470 мг/мл моногидрата гидрохлорида L-гистидина, приблизительно 19,1 мг/мл дигидрата α, α -трегалозы и приблизительно 0,0840 мг/мл полисорбата 20 и имеет рН, составляющий приблизительно 6,1.

12. Способ по п.2, в котором терапевтический белок представляет собой AMG 701, и концентрация белка AMG 701 составляет приблизительно 1 мг/мл.

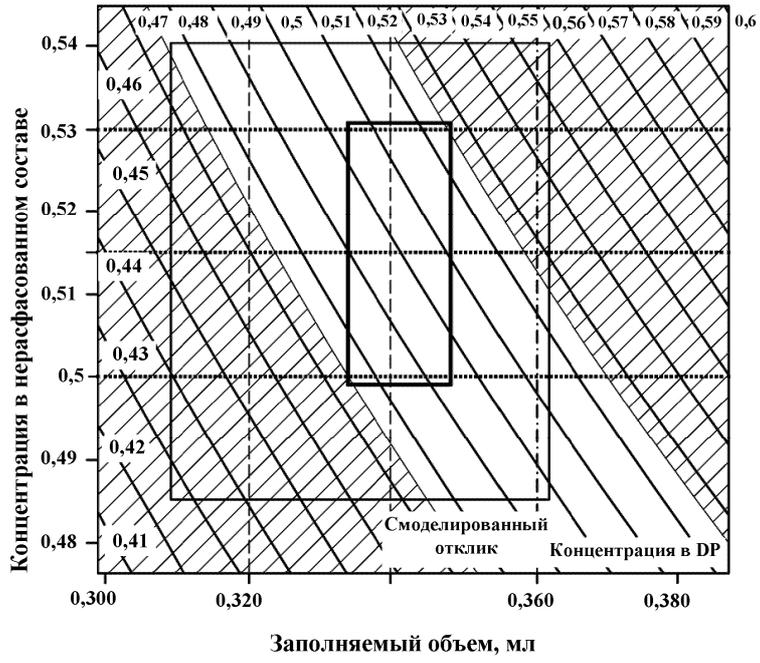
13. Способ по п.12, в котором восстановленный состав содержит приблизительно 1 мг/мл AMG 701, приблизительно 10 мМ L-глутаминовой кислоты, приблизительно 9,0% вес./об. сахарозы и приблизительно 0,010% вес./об. полисорбата 80 и имеет рН, составляющий приблизительно 4,2.

14. Способ по п.2, в котором терапевтический белок представляет собой AMG 330, и концентрация белка AMG 330 составляет приблизительно 0,5 мг/мл.

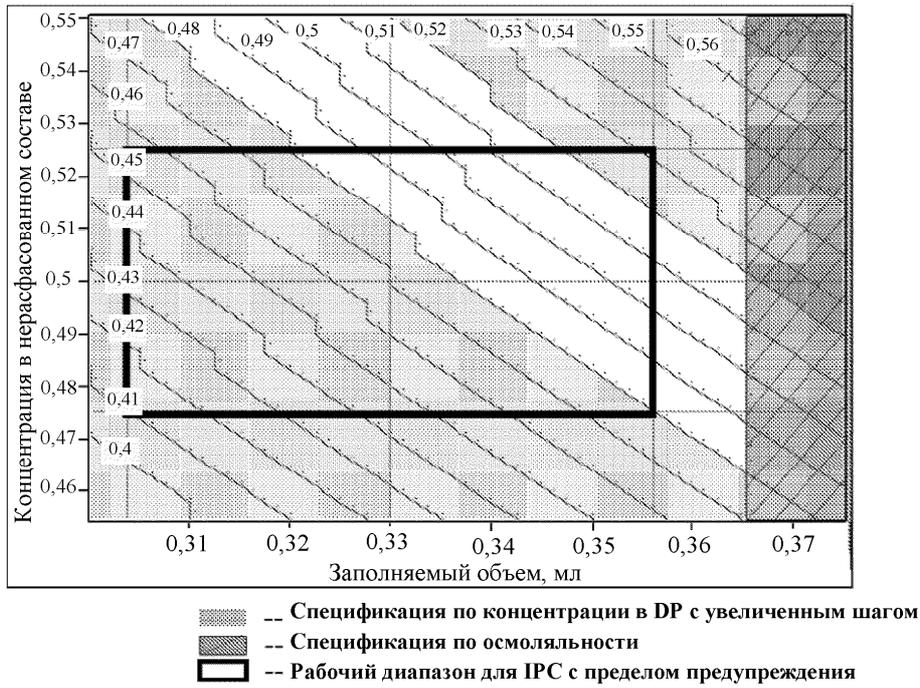
15. Способ по п.14, в котором восстановленный состав содержит приблизительно 0,5 мг/мл AMG 330, приблизительно 10 мМ фосфата калия, приблизительно 8,0% вес./об. сахарозы, приблизительно 1,0% вес./об. сульфобутилового эфира бета-циклодекстрина (SBE-CD) и приблизительно 0,010% вес./об. полисорбата 80 и имеет рН, составляющий приблизительно 6,1.

16. Способ по п.1, дополнительно включающий восстановление лиофилизованного состава, где концентрация белка в восстановленном составе является равной приблизительно 25 мг/мл или меньше.

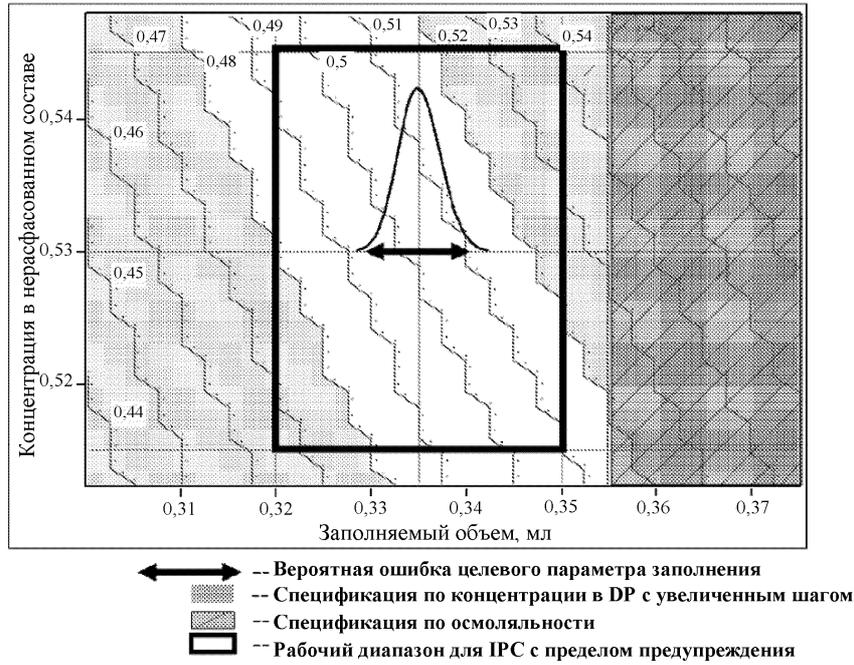
17. Способ по п.1, в котором терапевтический белок представляет собой биспецифическую конструкцию на основе одноцепочечного антитела.



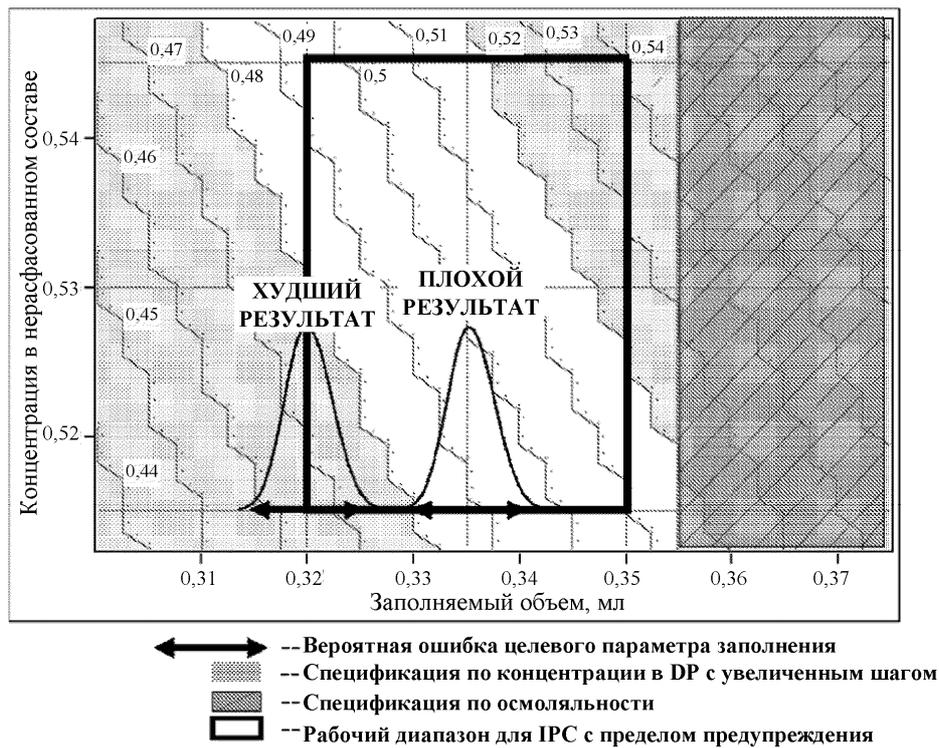
Фиг. 1



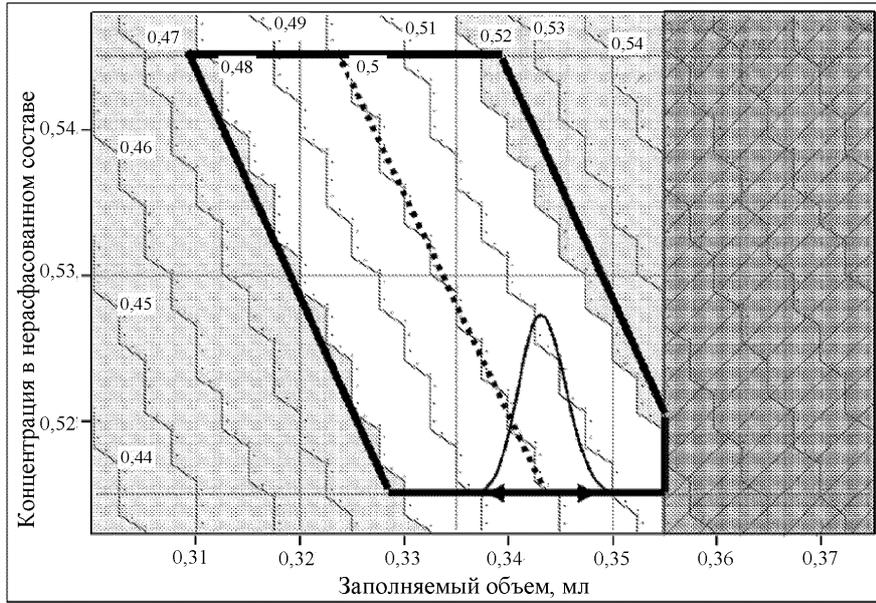
Фиг. 2



Фиг. 3

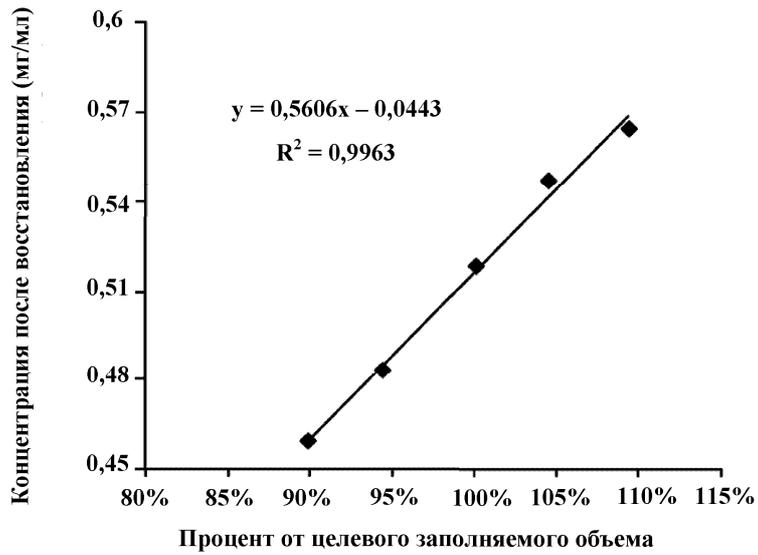


Фиг. 4

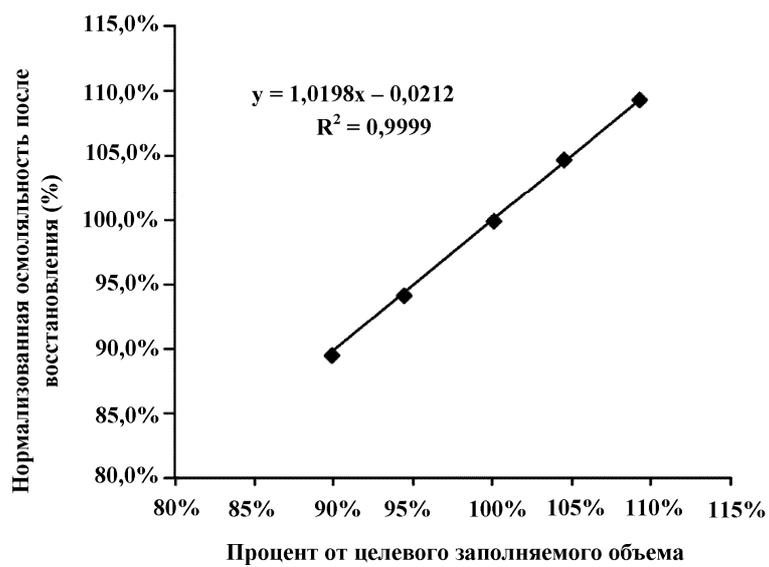


- ↔ --Вероятная ошибка целевого параметра заполнения
- ⋯ --Спецификация по концентрации в ДР с увеличенным шагом
- ▨ --Спецификация по осмоляльности
- ▭ -- Рабочий диапазон для ИРС с пределом предупреждения

Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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