

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043993**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.07.13**

**(21)** Номер заявки  
**201990900**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.10.06**

**(51)** Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

---

**(54) СТАБИЛЬНЫЙ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ БЕЛОК**

---

**(31)** 62/405,610

**(32)** 2016.10.07

**(33)** US

**(43)** 2019.07.31

**(86)** PCT/US2017/055651

**(87)** WO 2018/068012 2018.04.12

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Тан Сяолинь, Людвиг Дэвид Бретт  
(US)**

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

**(56)** CHANG LIUQUAN LUCY ET AL.: "Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 94, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 1427-1444, XP002482199, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20364, Lyophilization Process; page 1429, tables 1, 2, page 1430, column 2  
WO-A1-2010148337

BREEN E.D. ET AL.: "Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation", PHARMACEUTICAL RESEARCH, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 18, no. 9, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1345-1353, XP002550626, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/A:1013054431517, Materials; page 1346, 1347, last paragraph  
WO-A2-2012076670

GR NIREESHA ET AL.: "VOLUME 3: NUMBER 4: OCT: 2013, Lyophilization/Freeze Drying -An Review", INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES (IJNTPS), vol. 3, no. 4, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 87-98, XP055227935, page 89, paragraph 2  
WO-A1-9704801

---

**(57)** В изобретении предлагаются стабильные лиофилизированные терапевтические белковые композиции и способы их получения. В частности, описано использование воды в качестве пластификатора твердого остатка и стабилизатора белка. Также описано включение многокомпонентного стабилизатора, содержащего более крупную молекулярную единицу и меньшую молекулярную единицу. Также включение отжига после сушки в определенных условиях улучшает стабильность белка. Прогнозируется, что белки останутся стабильными в течение 24 месяцев при 25°C.

---

**B1**

**043993**

**043993**

**B1**

### Область техники

Изобретение в целом относится к области фармацевтической композиции биологических молекул. В частности, изобретение относится к стабильным лиофилизированным терапевтическим белковым композициям.

### Уровень техники

Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и рецепторные Fc-слитые белки, должны быть сформированы таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но и сохранить их стабильность при длительном хранении. Например, терапевтические белки (например, антитела) в жидком растворе склонны к агрегации, химическим модификациям или другим формам деградации, если раствор сформирован неправильно. Стабильность терапевтического белка в жидкой композиции зависит не только от типов наполнителей, используемых в композиции и от количества и пропорций этих наполнителей относительно друг друга, но также от концентрации растворимого белка и способа производства. Соображения помимо стабильности также должны быть приняты во внимание при получении терапевтической белковой композиции. Эти соображения включают в себя вязкость раствора и концентрацию антител, которые могут быть учтены в данной композиции. Таким образом, при получении терапевтического белка необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить композицию, которая остается стабильной в течение времени при температуре хранения, содержит адекватную концентрацию антитела или другого терапевтического белка и имеет другие свойства, которые позволяют удобно вводить композицию пациентам.

Жидкие композиции терапевтических белков, как правило, предназначены для обеспечения долгосрочной стабильности белка при замораживании или охлаждении, но часто не обеспечивают длительной стабильности при комнатной температуре. Одно решение, известное в данной области техники для сохранения стабильности и сохранения терапевтической активности белка, заключается в лиофилизации молекулы. Лيوфилизация (лиофильная сушка в контролируемых условиях) обычно используется для длительного хранения белков. Лيوфилизированный белок является по сути устойчивым к деградации, такой как агрегация, окисление и другие дегенеративные процессы, когда он находится в лиофилизированном состоянии (см., например, патент США № 6436897). Лيوфилизация обеспечивает сухой "остаток", который остается относительно стабильным при комнатной температуре в течение относительно длительного периода времени. Стабильность при комнатной температуре особенно важна для хранения и распределения терапевтических белков по всему миру, особенно в местах, где электричество и охлаждение ненадежны.

Лиопротекторы (также известные как стабилизаторы), такие как сахароза и трегалоза, часто включаются в композицию для предварительной лиофилизации, чтобы защитить белок от денатурации в процессе лиофилизации. Пластификаторы также могут быть включены для уменьшения общего времени релаксации и в некоторых случаях могут помочь сохранить нативную структуру белков. Пластификаторы включают сахарные спирты, такие как сорбитол и глицерин, другие полиолы и небольшое количество воды.

В исследованиях, направленных на оптимизацию хранения лиофилизированных белков при 5°C, Chang et al. исследовали влияние пластификаторов на стабильность белковых композиций. В лиофилизированных остатках, которые содержали весовое соотношение 1:1 сахарозы к белку (предварительно лиофилизированный белок с концентрацией 40 мг/мл) и без дополнительных пластификаторов, константа скорости агрегации в течение месяца при 50°C, как сообщалось, была выше 1,5% при содержании воды 2,4% и около 2% при содержании воды 3,3% (Id. в 1451, фиг. 4) ("Effect of Sorbitol and Residual Moisture on the Stability of Lyophilized Antibodies: Implications for the Mechanism of Protein Stabilization in the Solid State", J. Pharma. 94 (7):1445-1454 (2005)). Эксперимент также проводился при 40°C и 25°C с данными, представленными только для самых жестких из трех стрессовых условий. Chang et al. отметил редкие примеры документированных случаев оптимальной стабильности при хранении при промежуточном содержании влаги и предположил, что содержание остаточной влаги следует оптимизировать при разработке композиции, а не что-то, что просто нужно минимизировать (там же, 1451; см. также Breen et al., "Effect of Moisture on the Stability of a Lyophilized Humanized Monoclonal Antibody Formulation", Pharma. Res. 18 (9):1345-1353 (2001)). Высокие уровни влаги были показаны во всех исследованиях, приведенных Chang et al., чтобы уменьшить химическую стабильность составов; Hsu et al. "Determining the Optimum residual Moisture in Lyophilized Protein Pharmaceuticals", Develop. Biol. Стандарт 74:255-271 (1991)).

Ни одно из этих исследований не предполагает длительной стабильности (более года, двух лет или трех лет или более) при температуре выше 5°C, не говоря уже о 25°C, даже для протестированных композиций.

Леофилизированные композиции биотерапевтических препаратов продемонстрировали длительную стабильность при определенных условиях. Kallmeyer et al., WO1998022136A2, описывает стабильные композиции лиофилизированных антител низкой концентрации (например, до 8 мг/мл предварительно лиофилизированного раствора), которые содержат среди других наполнителей сахар (до 200 мг/мл после восстановления [например, сахароза, лактоза, мальтоза, рафиноза, трегалоза]), аминокислоту (1-100 мг/мл предварительно лиофилизированная [например, аргинин, лизин, орнитин]), поверх-

ностно-активное вещество (от 0,05 до 0,5 мг/мл после восстановления [например, полисорбаты и полиоксиэтилен - полиоксипропиленовые полимеры]) и, необязательно, буфер (10-20 мМ после восстановления [например, фосфат, ацетат, цитрат]) и/или изотонизирующий агент [например, NaCl, не более 30 мМ после восстановления). Kallmeyer описывает, что лиофилизат может храниться при комнатной температуре (т.е. 18-23°C) до двух лет, оставаясь стабильным. В данном документе, стабильность демонстрируется образованием очень маленьких или вообще никаких частиц в восстановленном лиофилизате, то есть менее 6000 частиц размером более 10 микрон или менее 600 частиц размером более 25 микрон.

Dix et al., WO2006104852A2, описывают стабильную лиофилизированную композицию VEGF-Trap (он же афлиберцепт), которая поддерживает биологическую активность в течение, по меньшей мере, трех месяцев. Эта заявка описывает предварительно лиофилизированный раствор, содержащий 5-75 мг/мл молекулы-ловушки, 5-50 мМ гистидинового буфера, 0,1-3% полиэтиленгликоля (ПЭГ; стабилизатор), 0,25-3% глицина (в качестве наполнителя) и 0,5-6% сахарозы (в качестве стабилизатора). Необязательно, предварительно лиофилизированный раствор содержит цитратный буфер (0,05 мМ) и/или от 0,003% до 0,005% полисорбата.

В дополнение к лиофилизированным белковым композициям для получения сухих белковых композиций также применяется распылительная сушка. Chen и Walsh (WO201307506A1) описывают сухие частицы микронизированного белка, имеющие диапазон диаметров от двух (2) до 30 мкм и средний диаметр от около 10 до 12 мкм и в некоторых случаях от около 6 до около 7 мкм. Эти частицы могут быть впоследствии покрыты полимером для дальнейшей стабилизации белка и обеспечения продолжительного высвобождения белка со временем в водной среде. Предварительно обработанный раствор белка, из которого были получены микронизированные частицы, содержал (1) 25 мг/мл белка и 0,1% полисорбата, (2) 25 мг/мл белка или (3) 50 мг/мл белка, 10 мМ фосфата и 2% сахарозы. Было показано, что белок, содержащийся в частицах микронизированного белка с полимерным покрытием, остается стабильным в течение по меньшей мере 14 дней.

Было показано, что отжиг после высушивания лиофилизата белка при 50°C приводит к начальной агрегации антител, превышающей 4% и константа скорости агрегации составляет около 2% агрегации в месяц (см. Wang et al., "The Impact of Thermal Treatment on the Stability of Freeze-Dried Amorphous Pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 Fusion Protein", 99(2) J. Pharma. Sci. 683-700 (2010)). Хотя FDA США может разрешить маркетинг композиции с начальной агрегацией 4%, такая скорость агрегации с течением времени будет неприемлемой для продаваемого фармацевтического препарата. В течение срока годности фармацевтической композиции не должно быть видимых изменений.

Сохраняется потребность в универсальных сухих белковых композициях, которые остаются стабильными в течение длительного периода времени при комнатной температуре. Универсальные сухие белковые композиции, среди прочего, пригодны для восстановления с использованием в виде жидких композиций, для объединения с полимерами с получением композиций или препаратов с пролонгированным высвобождением и для имплантации или доставки посредством множества других способов. В данном документе, заявители разработали улучшенный стабильный лиофилизат белка и способ его получения.

### Сущность изобретения

Относительно высокое содержание остаточной влаги может служить эффективным пластификатором для лиофилизированных терапевтических белков (так называемые терапевтические белки в "твердом состоянии"), который обеспечивает удивительную стабильность белка в течение по меньшей мере 24 месяцев хранения при комнатной температуре. В одном аспекте предложена стабильная при комнатной температуре композиция лиофилизированного терапевтического белка в твердом состоянии с низкой подвижностью, имеющая влажность от 0,5 до 10%. В другом аспекте предложен способ получения этой лиофилизированной терапевтической белковой композиции, стабильной при комнатной температуре. В частности, уровни остаточной влажности более 2%, более 3%, более 4%, более 5% или более 6% в лиофилизированном остатке, но менее 10%, менее 8%, менее 7% или менее 6% позволяют отжигать при относительно высоких температурах в течение длительного периода времени при комнатной температуре. Хотя это и не ограничено каким-либо механизмом действия, остаточное содержание воды во время процесса лиофилизации, по-видимому, позволяет осуществлять альфа-релаксацию, в то же время, предотвращая образование исходных белковых агрегатов при относительно высоких концентрациях фармацевтической композиции, предпочтительно от 50 до 200 мг/мл, еще более предпочтительно от 100 до 150 мг/мл.

В первом аспекте фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит стабильный белок, наполнитель и от около 0,5% до около 10% воды, от около 3% до около 6% воды, от около 4% до около 7% воды, от около 5% до около 8% воды, около 3%, около 4%, около 4,5% или около 6% воды по массе. Белок фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка остается стабильным в течение по меньшей мере одного месяца при комнатной температуре, которая может составлять 17-25°C, 20-25°C или около 25°C. В целом, под "стабильным" подразумевается то, что менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, менее чем 1% или очень мало или ни один из белков не деградирует в течение 18 месяцев хранения при комнатной температуре. Общим путем деградации белков является

образование агрегатов и других высокомолекулярных (НМВ) видов. НМВ виды могут быть обнаружены многими известными способами, такими как эксклюзионная хроматография и подвижность нативного или денатурированного электрофоретического геля, предпочтительно эксклюзионная хроматография. Деградация также включает образование химических продуктов, таких как дезамидированные остатки, восстановленные дисульфидные связи, гидролиз и фрагментацию пептидов и тому подобное, которые также могут быть измерены способами, известными в данной области.

В одном варианте реализации менее чем или около 2% белка деградирует после 24 месяцев хранения при температуре около 25°C. Деградация определяется процентным изменением высокомолекулярных частиц, измеренным методом эксклюзионной хроматографии. Нижний предел обнаруживаемой деградации с помощью этого метода составляет около 0,5%, а вариабельность анализа составляет около 0,2-0,3%.

Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток может включать один или несколько наполнителей в дополнение к белку и влаге. В одном варианте реализации наполнители включают буфер. Этот буфер может быть любым буфером, который поддерживает оптимальный рН для стабильности белка. Гистидин является таким буфером, который имеет рКа около 6,0 и способен эффективно буферизовать между рН от 4,8 до 7,2. В некоторых вариантах реализации наполнителем является гистидин. В предпочтительном варианте реализации гистидин присутствует в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке в количестве от около 0,34% до около 2,04 вес. %.

В одном варианте реализации наполнители включают стабилизатор. Стабилизаторы включают различные молекулы, такие как полиолы, сахара, аминокислоты, соли или любые их комбинации. Примеры используемых стабилизаторов включают сорбитол, глицерин, маннитол, трегалозу, сахарозу, аргинин, аланин, пролин, глицин, хлорид натрия или любую их комбинацию. В одном варианте реализации стабилизатор составляет от около 19,9% до около 82,2% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

Термин "стабилизатор" означает по меньшей мере один химический объект, который не является буфером или белком в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке. В некоторых вариантах реализации термин стабилизатор означает комбинацию химических элементов (то есть более чем один химический элемент), которые вместе служат для стабилизации белка или другой макромолекулы. Например, стабилизатор может представлять собой сахарозу или стабилизатор может представлять собой комбинацию сахарозы и аргинина. В некоторых вариантах реализации высокомолекулярное химическое вещество, такое как, например, сахароза или трегалоза, комбинируется с низкомолекулярным химическим веществом, таким как, например, аргинин, пролин, аланин, глицин, маннитол, сорбитол и/или глицерин. Не желая быть связанными теорией, меньший химический объект увеличивает подвижность, позволяя белку релаксировать до более низкого энергетического состояния.

В одном варианте реализации стабилизатор представляет собой только сахарозу, и этот стабилизатор составляет от около 3% до около 15%, предпочтительно около 5-11%, 4-7,5% или 5-7,5% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка в зависимости от присутствия других компонентов стабилизатора и количества белка, воды и других вспомогательных веществ. В одном варианте реализации массовое соотношение белка к стабилизатору составляет от 1:1 до 3:1, предпочтительно от 1,2:1 до 2:1, более предпочтительно от 1,5:1.

В одном варианте реализации стабилизатор включает сахарозу в комбинации с другим стабилизирующим агентом. Эти другие стабилизирующие агенты в комбинации с сахарозой включают любой один или несколько из аргинина, сорбитола, маннитола, глицерина и аланина. В одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аргинин, который может составлять от около 4,83% до около 19,3% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В некоторых вариантах реализации соотношение массы сахарозы к массе аргинину составляет от около 3,2:1 до около 3,4:1. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит сорбитол, который может составлять от около 8,07% до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит маннитол, который может составлять от около 8,07% до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит глицерин, который может составлять от около 4,23% до около 12,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В еще одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аланин, который может составлять от около 4,11% до около 12,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

В другом варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу, которая составляет от около 15,8% до около 70,2% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка, в зависимости от присутствия других стабилизаторов и количества белка, воды и других наполнителей.

В одном варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу в комбинации с другим стабилизатором. Эти другие стабилизаторы в комбинации с трегалозой включают любой один или несколько из аргинина, сорбитола, маннитола, глицерина и аланина. В одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аргинин, который может составлять от около 0,81% до около 14,3% от веса фар-

мацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит сорбитол, который может составлять от около 1,35 до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит глицерин, который может составлять от около 0,69% до около 12,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В еще одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аланин, который может составлять от около 0,69% до около 12,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

В другом варианте реализации, наполнители содержат поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может содержать неионогенный детергент, такой как жирный ацилированный полиэтокселированный сорбитан. В одном варианте реализации поверхностно-активное вещество обычно включает полисорбат или, в частности, полисорбат 80. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 0,21% до около 0,96% поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80, по массе.

В одном варианте реализации белок представляет собой терапевтический белок. В другом варианте реализации терапевтический белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки охватывают разнообразную группу молекул, включая антитела, фрагменты антител, рецепторы, лиганды, рекомбинантные молекулы, включая определяющие комплементарность области, лиганды и рецепторные домены. Антигенсвязывающие белки включают различные другие слитые (рекомбинантные или химерные) белки, такие как рецепторные Fc-слитые белки, которые включают молекулы-ловушки. В конкретном варианте реализации белок представляет собой терапевтическое антитело, такое как рекомбинантное человеческое или гуманизованное моноклональное антитело. Антитела включают в себя гибридные антитела, а также биспецифические антитела.

В одном варианте реализации белок составляет от около 6,27% до около 63,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 6,27% до около 18,9 мас.%. В других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 33,4% до около 63,7 мас.%.

Стабилизаторы включены в фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток, чтобы помочь поддерживать стабильность белка. Следовательно, фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит конкретные соотношения стабилизатора и белка. В некоторых вариантах реализации соотношение стабилизатора к белку составляет от около 0,22:1 до около 6,6:1 по массе. Различные варианты реализации включают соотношение стабилизатора к белку, выбранное из 0,44:1, 0,65:1, 0,87:1, 1,1:1 и 1,3:1, все по массе.

Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток является хранимым. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в закрытом пузырьке. Средством укупоривания может быть пробка. В других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в цилиндре шприца. В еще других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в одной камере двухкамерного автоинжектора.

В одном варианте реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток получают путем объединения белка, буфера, неионогенного поверхностно-активного вещества и одного или нескольких стабилизаторов в воде с получением предварительно лиофилизированного водного раствора. Затем раствор сушат сублимацией с получением остатка, содержащего не более 10% и не менее 0,5% влаги. Высушенный сублимацией (лиофилизированный) белок находится в "твердом состоянии". В конкретном варианте реализации белок представляет собой терапевтическое рекомбинантное человеческое или гуманизованное моноклональное антитело.

Согласно другому аспекту предложен способ получения композиции, содержащей терапевтический белок и не более 10% воды и не менее 0,5% воды.

В одном варианте реализации способ включает стадии получения водного образца, содержащего белок и наполнитель, в контейнере. Контейнер может представлять собой, помимо прочего, пузырек, цилиндр шприца или камеру двухкамерного автоинжектора. Контейнер достаточно открыт, чтобы позволить выделение водяного пара. Контейнер, содержащий водный образец, помещают в камеру; тепло отводится от образца до достижения первой температуры, при которой в образце образуются ледяные кристаллы. Воздух удаляют из камеры для достижения первого давления. Затем к образцу добавляют тепловую энергию для достижения второй температуры, позволяющей удалять воду из образца сублимацией. Остаточная вода может оставаться захваченной в образце после сублимации, что требует дополнительной второй стадии сушки. Эта вторая стадия сушки осуществляется путем прикладывания тепловой энергии к образцу при поддержании первого давления в камере, тем самым достигая третьей температуры. При этой температуре вода десорбируется из образца до достижения уровня влажности не более 10% и не менее 0,5%.

В одном варианте реализации во время начальной стадии сублимации и первичной сушки тепло отводится из водного образца со скоростью около 0,5°C/мин. В одном варианте реализации первая темпе-

ратура составляет около  $-45^{\circ}\text{C}$ . В другом варианте реализации первая температура поддерживается в течение около 60 мин. В еще одном варианте реализации водный образец выдерживают при  $5^{\circ}\text{C}$  в течение около 30 мин до достижения первой температуры.

В одном варианте реализации стадия первичной сушки проводится при второй температуре около  $-25^{\circ}\text{C}$ . В одном варианте реализации вторая температура достигается путем увеличения температуры полки со скоростью около  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . В одном варианте реализации вторая температура поддерживается в течение около 50 ч. В одном варианте реализации давление в камере во время первичной сушки составляет около 100 мТорр.

В одном варианте реализации стадию вторичной сушки проводят при третьей температуре около  $35^{\circ}\text{C}$ . В одном варианте реализации скорость изменения составляет около  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . В одном варианте реализации образец выдерживают при третьей температуре в течение около 6 ч.

После вторичной сушки в одном варианте реализации пузырек закупоривают при давлении в камере около 608000 мТорр. В одном варианте реализации камера заполняется газообразным  $\text{N}_2$  до закупоривания. В одном варианте реализации пузырек закупоривают бутилкаучуковой пробкой для лиофилизации 4432/50 с покрытием Flurotec®.

В одном варианте реализации высушенный образец отжигают для релаксации белка в более низкое энергетическое состояние и улучшения его общей стабильности. Для отжига образца, к образцу прикладывается тепловая энергия для достижения четвертой температуры. В некоторых вариантах реализации образец выдерживают при четвертой температуре в течение по меньшей мере около 24 ч по меньшей мере, около 48 ч или, по меньшей мере около 60 ч для достижения оптимальной эффективной релаксации (альфа- и бета-релаксации) белка. Как только белок достигнет оптимального состояния релаксации, контейнер закрывается.

В одном варианте реализации четвертая температура, то есть температура отжига, ниже температуры стеклования образца после стадии десорбции воды. В конкретном варианте реализации температура отжига составляет около  $70^{\circ}\text{C}$ . В другом конкретном варианте реализации температура отжига составляет около  $45^{\circ}\text{C}$ . В одном варианте реализации образец выдерживают при температуре отжига в течение около 72 ч. Поскольку разные белки имеют разные биофизические характеристики, в некоторых вариантах реализации четвертая температура определяется с помощью модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии (МДСК). В данном документе, в калориметр загружают образец композиции с лиофилизированным белком, который прошел стадию вторичной сушки. Затем образец подвергают инкрементному нагреву через стеклование, в то время как контролируется тепловой поток.  $T_g$  определяется. Затем образцы выдерживают при различных температурах ниже  $T_g$  в течение разного времени, чтобы вызвать энталпийную релаксацию молекул в лиофилизированном остатке. Затем "релаксированные" образцы подвергают ДСК или МДСК и определяют площадь пика (теплоемкость в зависимости от температуры) вследствие энталпийного восстановления (см. Luthra et al., "Effects of annealing on enthalpy relaxation in lyophilized disaccharide formulations: mathematical modeling of DSC curves", 97(8) J Pharm Sci. 3084-99, 2008 г. и L. Thomas, "Modulated DSC® Paper #5: Measurement of Glass Transitions and Enthalpy Recovery", публикация TA Instruments TP 010, New Castle DE, доступная для загрузки во всемирной паутине по адресу [tainstruments.com](http://tainstruments.com) (по состоянию на 13 мая 2016 г.). Те суб- $T_g$  температуры и время которые обеспечивают оптимальную энталпийную релаксацию, выбираются для четвертой (или температуры отжига) температуры и времени; см. также W.Q., "Calorimetric analysis of cryopreservation and freeze-drying formulations", 1257 Methods Mol. Biol. 163-79 (2015).

В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор (т.е. водный образец; он же водный раствор) содержит несколько наполнителей, таких как один или несколько стабилизаторов, один или несколько буферов и, необязательно, одно или несколько поверхностно-активных веществ.

В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор, а также восстановленная лиофилизированная жидкая композиция имеет рН, которая помогает поддерживать структуру и функцию белка. В конкретных вариантах реализации жидкие предварительно лиофилизированные и впоследствии восстановленные жидкие композиции имеют рН около  $6,0 \pm 2$ . Молекулы, которые буферизуют при рН около 6, считаются используемыми в этом варианте реализации. Таким образом, в одном варианте реализации буфер содержит гистидин. В конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 10 мМ гистидина.

В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор содержит по меньшей мере один стабилизатор. В некоторых вариантах реализации стабилизатор или комбинация стабилизаторов включает один или несколько из трегалозы, сорбитола, глицерина, аргинина, аланина, маннитола, сахарозы, пролина, NaCl и глицина.

В одном варианте реализации стабилизатор или комбинация стабилизаторов включает сахарозу. В конкретном варианте реализации стабилизатор содержит сахарозу в концентрации около 10% (вес./об.) в водном растворе. В одном случае сахароза является единственным стабилизатором. В другом случае водный раствор содержит в качестве стабилизатора около  $3\% \pm 0,1\%$  (вес./об.) аргинина в дополнение к 10% сахарозы (вес./об.).

В других вариантах реализации стабилизатор содержит сахарозу и по меньшей мере один другой молекулярный объект. В некоторых вариантах реализации водный раствор содержит около 5% сахарозы и один другой стабилизатор. В одном конкретном варианте реализации водный раствор содержит 5% сахарозы и любой из (а) около 1,3%±0,1% (вес./об.) аланина, (b) около 1,5%±0,1% (вес./об.) аргинина, (с) около 1,34%±0,1% (вес./об.) глицерина, (d) около 2,66%±0,1% (вес./об.) маннитола и (е) около 2,66%±0,1% (вес./об.) сорбитола.

В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит сахарозу и аргинин в различных концентрациях и пропорциях. В конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 7,5% сахарозы и 2,3%±0,1% аргинина. В другом конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 12,5% сахарозы и 3,9%±0,1% аргинина. В еще одном конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 15% сахарозы и 4,6%±0,1% аргинина.

В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит трегалозу либо в качестве единственного стабилизатора, либо в комбинации с другим стабилизатором. В одном варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу в концентрации около 10% (вес./об.) в водном растворе. В другом варианте реализации водный раствор содержит около 9,09% (вес./об.) трегалозы и любой из 0,48% (вес./об.) сорбитола, 0,24% (вес./об.) глицерина, 0,28% (вес./об.) аргинина и 0,24% (вес./об.) аланина. В другом варианте реализации водный раствор содержит 8,33% (вес./об.) трегалозы и любой из 0,89% (вес./об.) сорбитола, 0,45% (вес./об.) глицерина, 0,51% (вес./об.) аргинина и 0,43% (вес./об.) аланина. В другом варианте реализации водный образец содержит 6,66% (вес./об.) трегалозы и любой из 1,77% (вес./об.) сорбитола, 0,9% (вес./об.) глицерина, 1,03% (вес./об.) аргинина и 0,87% (вес./об.) аланина. В другом варианте реализации водный образец содержит 5% (вес./об.) трегалозы и любой из 2,66% (вес./об.) сорбитола, 1,34% (вес./об.) глицерина, 1,54% (вес./об.) аргинина и 1,3% (вес./об.) аланина.

Терапевтическим белком этого процесса может быть любой терапевтический белок, включая более мелкие пептиды, а также более крупные белки. В одном варианте реализации терапевтический белок изобретения составляет более 100 килодальтон или около 150 килодальтон или более. Терапевтический белок, включенный в данное изобретение, может представлять собой выделенный эндогенный белок, гетерологически экспрессированный белок и/или рекомбинантный белок, такой как химерный белок слияния или вариант эндогенного полипептида. В одном варианте реализации терапевтический белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки охватывают любой белок, который связывается с другим молекулярным объектом. Например, антигенсвязывающие белки включают антитела, биспецифичные антитела, фрагменты антител, слитые белки ScFv, белки, содержащие область определения комплементарности (CDR), лиганды, рецепторы, фрагменты лигандов, фрагменты рецепторов, слитые белки, содержащие лигандные и/или рецепторные домены и рецепторные Fc-слитые белки, включая молекулы-ловушки.

В одном варианте реализации терапевтический белок представляет собой антитело. В конкретном варианте реализации терапевтическое антитело представляет собой моноклональное антитело. В более конкретном варианте реализации терапевтический белок представляет собой рекомбинантное человеческое или гуманизированное антитело, продуцируемое в гетерологичной клеточной линии. В другом варианте реализации терапевтический белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок. В другом более конкретном варианте реализации терапевтический белок представляет собой молекулу-ловушку, такую как молекула афлиберцепта (ловушка VEGF) или молекула рилонацепта (ловушка IL-1).

В некоторых вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является низкой, что включает диапазон концентраций, больший, чем ноль (то есть низкий или меньший, чем 1 мкг/мл), и меньший или равный 25 мг/мл. В одном варианте реализации с низкой концентрацией, концентрация антитела составляет около 2 мг/мл.

В других вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является средней, что включает диапазон концентраций, превышающий 25 мг/мл и меньший или равный 100 мг/мл. В одном варианте реализации со средней концентрацией, концентрация антитела составляет около 50 мг/мл.

В других вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является высокой, что включает диапазон концентраций, превышающий 100 мг/мл и меньший или равный 200 мг/мл. В одном варианте реализации с высокой концентрацией, концентрация антитела составляет около 150 мг/мл.

В других вариантах реализации концентрация антитела в водном растворе является сверхвысокой, что включает диапазон концентрации антитела, превышающий 200 мг/мл. В одном варианте реализации с сверхвысокой концентрацией, концентрация антитела составляет около 205 мг/мл.

Как отмечено выше, но без ограничения каким-либо механизмом действия, вода может служить пластификатором для лиофилизированного продукта, что неожиданно улучшает стабильность белка. Таким образом, в одном варианте реализации содержание влаги в полученной композиции (то есть стабильной лиофилизированной композиции) составляет  $\geq 2\%$  и  $\leq 10$  мас.%. В другом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет  $\geq 3\%$  и  $\leq 6$  мас.%. В другом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет  $\geq 4\%$  и  $\leq 6$  мас.%. В одном специфическом варианте реализации содержание

влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 6%. В другом специфическом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 4,5%. В еще одном специфическом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 3%.

В одном варианте реализации лиофилизированный белок стабилен в течение по меньшей мере 24 месяцев при комнатной температуре. В конкретном варианте реализации  $\leq$  около 2% фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка деградирует после 24 месяцев хранения при 25°C. Не ограничиваясь каким-либо механизмом, деградация может включать протеолиз, химическую модификацию, агрегацию и тому подобное. Агрегация является распространенной формой деградации антител и наблюдается при образовании высокомолекулярных (HMW) частиц. Деградация может быть определена с использованием любого анализа белка, известного в данной области техники или еще не изобретенного. В специфическом варианте реализации деградацию антитела определяют путем измерения изменения в процентах высокомолекулярных (HMW) частиц с помощью эксклюзионной (SE) хроматографии.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 и 2 представлены гистограммы, изображающие влияние температуры и влажности на стабильность белка с течением времени. Ось X показывает время в месяцах и температуру. Ось Y показывает процентное изменение количества видов высокомолекулярного белка. Для каждой температуры отдельные гистограммы представляют увеличение процентного содержания воды (вес./вес.) слева направо вдоль оси X, 0% воды (незакрашенные столбцы), 0,5% воды (светлые столбцы), 1,5% воды (нисходящий заштрихованный заполненный столбец), 3,0% воды (вертикальные заполненные столбцы), 4,5% воды (горизонтальные заполненные столбцы), 6% воды (открытые ромбовидные столбики), 8% воды (клетчатые столбики) и 10% воды (темные штриховые столбики).

#### **Подробное описание сути изобретения**

Перед ознакомлением с описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Абсолютные количества и относительные количества наполнителей, ингредиентов и других материалов могут быть описаны по массе или в молях. Единицы массы могут быть выражены в граммах, миллиграммах, микрограммах и т.п.). Термин "вес", такой как "вес/об.", означает "массу". Относительные количества могут быть выражены в процентах по весу (то есть в процентах по массе), где один (1) процент массы к объему (вес./об.) означает 1 г материала на 100 мл объема. Также, например, один (1) компонент ингредиента "А" на один (1) компонент ингредиента "В" по весу означает, например, что на каждый (1) грамм ингредиента "А" приходится один (1) грамм ингредиента "В". Также, например, один процент (1%) по массе ингредиента "А" означает, например, что на каждые 100 г общей массы частицы приходится один (1) грамм ингредиента "А". Относительные количества ингредиента также могут быть выражены в значениях моль или количество молекул на данный объем, например, миллимоль на литр (миллимоль (мМ)), или на другой ингредиент, например, X-компонент "А" на Y-компонент "В" в моль означает, что на каждые X моль "А" есть Y моль "В".

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или при испытании данного изобретения, в настоящий момент описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки для полного описания.

#### **Наполнители.**

Наполнитель представляет собой ингредиент, добавляемый вместе с активным лекарственным веществом в фармацевтическую композицию. Наполнители помогают стабилизировать лекарственное вещество и/или увеличивать объем композиции. Термин ингредиент используется взаимозаменяемо с наполнителями.

Наполнители включают различные вещества для различных целей, таких как буферирование, набухание, растворение, стабилизация, пластификация и защита лекарственного вещества. Защитные средства защищают от теплового стресса и/или физического стресса, такого как стресс, вызываемый перемешиванием. Буферы хорошо известны в данной области.

Обычно в водный раствор белка перед лиофилизацией включается буфер для стабилизации белка перед лиофилизацией и после восстановления. Буфер может быть включен в раствор для лиофилизации в концентрации от 1 мМ до 100 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации буфер включен в раствор для лиофилизации при около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации буфер присутствует в растворе для лиофилизации в концентрации от 5 мМ $\pm$ 0,75 мМ до 15 мМ $\pm$ 2,25 мМ; от 6 мМ $\pm$ 0,9 мМ до 14 мМ $\pm$ 2,1 мМ; от 7 мМ $\pm$ 1,05 мМ до 13 мМ $\pm$ 1,95 мМ; от 8 мМ $\pm$ 1,2 до 12 мМ $\pm$ 1,8 мМ; от 9 мМ $\pm$ 1,35 мМ до 11 мМ $\pm$ 1,65 мМ; 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ; или около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации буферная система раствора для лиофилизации содержит гистидин, фосфат и/или ацетат при 10 мМ $\pm$ 1,5 мМ.

В некоторых вариантах реализации буфер выбран из химического вещества, способного буферизоваться где-то в диапазоне рН от около 3 до около 9 или в диапазоне рН от около 3,7 до около 8,0. Например, предварительно лиофилизированный раствор может иметь рН около 3,4, около 3,6, около 3,8, около 4,0, около 4,2, около 4,4, около 4,6, около 4,8, около 5,0, около 5,2, около 5,4, около 5,6, около 5,8, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,6, около 6,8, около 7,0, около 7,2, около 7,4, около 7,6, около 7,8 или около 8,0.

Буфер может представлять собой комбинацию отдельных буферов, такую как, например, комбинация гистидина и ацетата (гис-ацетатный буфер). В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 3,5 до около 6 или от около 3,7 до около 5,6, такой как диапазон, забуференный ацетатом. В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 5,5 до около 8,5 или от около 5,8 до около 8,0, такой как диапазон, забуференный фосфатом. В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 5,0 до около 8,0 или от около 5,5 до около 7,4, такой как диапазон, забуференный гистидином.

Наполнители включают стабилизаторы. Используемый в данном документе стабилизатор добавляют к раствору для лиофилизации, чтобы стабилизировать белок от агрегации или другой дегградации. Стабилизация может происходить путем контроля динамики стеклования в процессе лиофилизации или путем сохранения естественной структуры белка путем специфического взаимодействия стабилизатора с белком. Для обсуждения биофизики стабилизаторов во время лиофилизации, см. Chang et al., "Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?" 94(7) J. Pharm. Sci. 1427-44 (2005).

Стабилизаторы для включения в раствор для лиофилизации включают полиолы, сахара, соли (например, хлорид натрия), аминокислоты и тому подобное. Различные индивидуальные стабилизаторы могут использоваться отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими стабилизаторами для оптимального стабилизирующего эффекта. Например, полиол может быть объединен с сахаром, сахар с аминокислотой, полиол с аминокислотой, соль с сахаром, соль с аминокислотой, соль с полиолом и тому подобное.

Полиолы представляют собой органические молекулы с более чем одной гидроксильной группой (-ОН). Полиолы включают мономеры, а также полимеры. Сахарные спирты представляют собой подгруппу полиольных сахарных спиртов, которые могут служить полезными стабилизаторами, включают маннитол, ксилитол, сорбитол, изомальтол, эритритол, мальтитол и глицерин. Другие мономерные полиолы включают этиленгликоль, пропиленгликоль и пентаэритритол. Полимерные полиолы могут быть сложными полиэфирами или простыми полиэфирами субъединиц полиола. Используемые для примера полимерные полиолы включают полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и поли(тетраметиленовый эфир)гликоль.

Сахара используются в качестве стабилизаторов (а также в качестве наполнителей). Сахара можно отнести к категории восстанавливающих или невосстанавливающих сахаров.

Невосстанавливающие сахара включают дисахариды сахарозу и трегалозу. Восстанавливающие сахара включают глюкозу, мальтозу и лактозу. Как правило, невосстанавливающие сахара являются предпочтительными для лиофилизации белка, поскольку восстанавливающие сахара могут восстанавливать белки посредством реакции Майяра; см. в целом Lavakumar et al., "Lyophilization/Freeze Drying - A Review", 3(4) Int. J. Novel Trends in Pharm. Sci. 2277-2782 (2013). Дисахариды трегалоза и сахароза относительно инертны и имеют тенденцию образовывать аморфное стекло во время лиофилизации. Трегалоза или сахароза, отдельно или в комбинации с аминокислотой или полиолом, используются в качестве стабилизатора в практике данного изобретения.

В одном варианте реализации трегалоза используется в качестве единственного стабилизатора. В других вариантах реализации трегалоза комбинируется с полиолом. В некоторых вариантах реализации стабилизатор представляет собой комбинацию трегалозы и сорбитола или трегалозы и глицерина. В других вариантах осуществления трегалоза комбинируется с аминокислотой. В частности, трегалоза комбинируется с аланином, или трегалоза комбинируется с аргинином.

В другом варианте реализации сахароза используется в качестве единственного стабилизатора. В других вариантах реализации сахароза комбинируется с полиолом. В специфических вариантах реализации стабилизатор представляет собой комбинацию сахарозы и маннитола, сахарозы и сорбитола или сахарозы и глицерина. В других вариантах реализации сахароза комбинируется с аминокислотой. В частности, сахароза комбинируется с аргинином или сахароза комбинируется с аланином.

Аминокислоты используются в качестве стабилизаторов. Глицин является обычно используемым наполнителем и стабилизатором. Другие используемые аминокислоты включают аргинин, аланин и пролин. В некоторых вариантах реализации аргинин используется в качестве стабилизатора. В некоторых специфических вариантах реализации аргинин комбинируется с сахарозой или аргинин комбинируется с трегалозой. В других вариантах реализации аланин используется в качестве стабилизатора. В некоторых специфических вариантах реализации аланин комбинируется с сахарозой или аланин комбинируется с трегалозой.

В некоторых случаях одно или несколько поверхностно-активных веществ могут использоваться в качестве наполнителя. Предполагается, что поверхностно-активные вещества обеспечивают дополни-

тельную стабильность за счет снижения гидрофобного взаимодействия белок-белок и, как результат, образования высокомолекулярных частиц (т.е. агрегатов). В некоторых вариантах реализации одно или несколько поверхностно-активных веществ могут быть включены в предварительно лиофилизированный содержащий белок водный раствор. В других вариантах реализации одно или несколько поверхностно-активных веществ могут быть включены в раствор разбавителя для разведения. Поверхностно-активные вещества включают вещества, которые уменьшают поверхностное натяжение жидкости, в которой она растворена и/или уменьшают межфазное натяжение между маслом и водой. Поверхностно-активные вещества могут быть ионными или неионными. Типичные неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в предварительно лиофилизированный раствор или в раствор после восстановления, включают, например, алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды (например, октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид MEA, кокамид DEA и кокамид TEA. Специфические неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в предварительно лиофилизированный водный раствор (или впоследствии восстановленный раствор), включают, например, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (или полисорбаты), такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полочсамеры, такие как полочсамер 188, полочсамер 407; полиэтилен-полипропиленгликоль; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат. Полисорбат 80 также известен как TWEEN 80, сорбитанмоноолеат и полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

Количество поверхностно-активного вещества, содержащегося в растворе для предварительной лиофилизации или растворе для восстановления, может варьироваться в зависимости от специфических свойств и целей, желательных для лиофилизованной композиции. В некоторых вариантах реализации раствор для предварительной лиофилизации или раствор для восстановления может содержать от около 0,001% (вес./об.) до около 0,5% (вес./об.) поверхностно-активного вещества (например, полисорбат 20 или полисорбат 80). Например, раствор для предварительной лиофилизации может содержать около 0,001%; около 0,0015%; около 0,002%; около 0,0025%; около 0,003%; около 0,0035%; около 0,004%; около 0,0045%; около 0,005%; около 0,0055%; около 0,006%; около 0,0065%; около 0,007%; около 0,0075%; около 0,008%; около 0,0085%; около 0,009%; около 0,0095%; около 0,01%; около 0,015%; около 0,016%; около 0,017%; около 0,018%; около 0,019%; около 0,02%; около 0,021%; около 0,022%; около 0,023%; около 0,024%; около 0,025%; около 0,026%; около 0,027%; около 0,028%; около 0,029%; около 0,03%; около 0,031%; около 0,032%; около 0,033%; около 0,034%; около 0,035%; около 0,036%; около 0,037%; около 0,038%; около 0,039%; около 0,04%; около 0,041%; около 0,042%; около 0,043%; около 0,044%; около 0,045%; около 0,046%; около 0,047%; около 0,048%; около 0,049%; около 0,05%; около 0,051%; около 0,052%; около 0,053%; около 0,054%; около 0,055%; около 0,056%; около 0,057%; около 0,058%; около 0,059%; около 0,06%; около 0,061%; около 0,062%; около 0,063%; около 0,064%; около 0,065%; около 0,066%; около 0,067%; около 0,068%; около 0,069%; около 0,07%; около 0,071%; около 0,072%; около 0,073%; около 0,074%; около 0,075%; около 0,076%; около 0,077%; около 0,078%; около 0,079%; около 0,08%; около 0,081%; около 0,082%; около 0,083%; около 0,084%; около 0,085%; около 0,086%; около 0,087%; около 0,088%; около 0,089%; около 0,09%; около 0,091%; около 0,092%; около 0,093%; около 0,094%; около 0,095%; около 0,096%; около 0,097%; около 0,098%; около 0,099%; около 0,10%; около 0,15%; около 0,20%; около 0,25%; около 0,30%; около 0,35%; около 0,40%; около 0,45% или около 0,50% поверхностно-активного вещества (например, полисорбат 20 или полисорбат 80).

Один или несколько пластификаторов включены в композицию лиофилизованного белка. Пластификаторы обычно используются для увеличения текучести или гибкости системы. Считается, что повышенная текучесть является результатом того, что пластификатор увеличивает свободный объем системы и снижает температуру стеклования. Добавление пластификаторов модифицирует как альфа-релаксацию, так и бета-релаксацию в лиофилизованном остатке. Альфа-релаксация также известна как первичная или стеклянная релаксация и является глобальным процессом релаксации. Бета-релаксация это более локальный процесс, связанный с движением цепи белкового полимера, который может быть лучше модифицирован меньшими молекулами (т.е. пластификаторами). Оба процесса релаксации уменьшают общую энергию системы и, как полагают, особенно в случае бета-релаксации, влияют на стабильность белка. В области биофизики белка общеизвестно, что пластификаторы уменьшают время бета-релаксации и могут одновременно снижать стабильность белка (см., например, Cicerone and Douglas, " $\beta$ -Relaxation governs protein stability in sugar-glass matrices", *Soft Matter* 8:2983-2991, 2012).

Изобретение также относится к одному из вариантов реализации лиофилизированных белковых композиций, содержащих один или несколько Сахаров в комбинации с одним или несколькими пластификаторами в определенном соотношении для создания "стабилизатора", который обеспечивает достаточную гибкость и альфа-релаксацию остатка, сохраняя или повышая стабильность белка. В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит весовое соотношение сахара к пластификатору (т.е. массы к массе) от около 19:1 до около 1:1. В некоторых вариантах реализации стабилизатор включает весовое соотношение сахара к пластификатору около 19:1, около 18:1, около 17:1, около 16:1, около 15:1, около 14:1, около 13:1, около 12:1, около 11:1, около 10:1, около 9:1, около 8:1, около 7:1, около 6:1, около 5:1, около 4:1, около 3:1, около 2:1 или около 1:1.

Подходящие пластификаторы включают полиолы, такие как сорбитол, глицерол (глицерин), маннитол и ксилитол, аминокислоты, такие как глицин, аргинин, пролин и аланин, и соли, такие как NaCl. Интересно, что вода также может выполнять функцию пластификатора. Тем не менее, вода, как правило, не одобряется, потому что она является одновременно химическим реагентом и пластификатором, что приводит к увеличению подвижности и снижению  $T_g$ . Повышенная подвижность коррелирует с повышенной реакционной способностью и гидролизом внутри системы.

Повышенная реакционная способность и гидролиз разрушают стабильность белка; см. Terakita et al., "The Influence of Water on the Stability of Lyophilized Formulations with Inositol and Mannitol as Excipients", 57(5) Chem. Pharm. Bull. 459-463 (2009).

Как описано выше, маннитол, глицерин, сорбитол и глицин в комбинации с водой используются в некоторых вариантах реализации в качестве пластификатора. Не будучи связанными теорией, считается, что эти молекулы в конкретных вариантах реализации композиции уменьшают время бета-релаксации, а также увеличивают стабильность белка.

В некоторых специфических вариантах реализации сахарную сахарозу или трегалозу комбинируют с пластификатором сорбитолом в массовом соотношении около 4:1, около 3,9:1, около 3,8:1, около 3,7:1, около 3,6:1, около 3,5:1, около 3,4:1, около 3,3:1, около 3,2:1, около 3,1:1, около 3:1, около 2,9:1, около 2,8:1, около 2,7:1, около 2,6:1, около 2,5:1, около 2,4:1, около 2,3:1, около 2,2:1, около 2,1:1, около 2:1, около 1,9:1, около 1,8:1, около 1,7:1, около 1,6:1, около 1,5:1, около 1,4:1, около 1,3:1, около 1,2:1, около 1,1:1 или около 1:1. В других специфических вариантах реализации, сахар сахароза или трегалоза объединяют с пластификатором аргинином в массовом соотношении около 33:1, около 32:1, около 31:1, около 30:1, около 29:1, около 28:1, около 27:1, около 26:1, около 25:1, около 24:1, около 23:1, около 22:1, около 21:1, около 20:1, около 19:1, около 18:1, около 17:1, около 16:1, около 15:1, около 14:1, около 13:1, около 12:1, около 11:1, около 10:1, около 9:1, около 8:1, около 7:1, около 6:1, около 5:1, около 4,5:1, около 4:1, около 3,5:1 или около 3:1.

Изобретение также обеспечивает аспект, что вода служит стабилизирующим пластификатором в лиофилизированной композиции и помогает снизить скорость агрегации белка в лиофилизированных композициях, хранящихся при комнатной температуре. Количество влаги, необходимое для эффективной стабилизации белка в лиофилизированном остатке при комнатной температуре, увеличивается с увеличением содержания белка и уменьшается с уменьшением содержания белка. Таким образом, лиофилизированная композиция, полученная из предварительно лиофилизированного раствора, содержащего 50 мг/мл белка, может требовать более низкого содержания влаги, чем лиофилизированная композиция, полученная из предварительно лиофилизированного раствора, содержащего 150 мг/мл белка. Кроме того, оптимальное количество влаги, необходимое для эффективной стабилизации белка в лиофилизированном остатке, изменяется в зависимости от температуры хранения. Например, промежуточное количество влаги используемое для длительного хранения белка лиофилизата при комнатной температуре. При более высоких температурах хранения (например, 37°C) требуется меньше влаги.

Например, на фиг. 1 показано влияние влаги на стабильность типичной композиции для лиофилизации антител, хранящейся при 25, 37 или 50°C. В данном документе предварительно лиофилизированная композиция содержит 150 мг/мл IgG, 5% сахарозы и 1,54% аргинина. Конечный лиофилизированный остаток содержал влагу (вес./вес.) в количестве 0%, 0,5%, 1,5%, 3,0%, 4,5%, 6%, 8% или 10%. Как показано на фиг. 1, более высокая температура хранения привела к снижению стабильности белка в течение 2-3 месяцев. Интересно, что оптимальное количество влаги для обеспечения максимальной стабильности было выше при комнатной температуре, чем при 37 или 50°C. В этом конкретном примере оптимальное содержание влаги для стабильности белка при комнатной температуре составляло около 4,5% (вес./вес.) и от около 1,5% до около 3% при хранении при 50°C в течение 2 месяцев. Более долгосрочные данные о стабильности проиллюстрированы на фиг. 2, которая показывает примерную композицию для лиофилизации антител, хранящуюся при 25 и 37°C в течение 12 и 6 месяцев соответственно. Как показано на фиг. 2, содержание влаги от 3,0% до 4,5% (вес./вес.) обеспечивает лучшую стабильность при обеих испытанных температурах и содержание влаги 4,5% обеспечивает наибольшую стабильность через 12 месяцев при комнатной температуре (25°C).

В одном варианте реализации изобретение предлагает композицию стабильного лиофилизированного белка (например, антитела), содержащую от 1,5% до 8% воды (вес./вес.), которая остается стабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре (25°C), где стабильность относится к менее чем 2% увеличению высокомолекулярных видов в течение 12-месячного периода хранения. В другом варианте реализации изобретение обеспечивает композицию стабильного лиофилизированного белка (например, антитела), содержащую от 3,0% до 4,5% воды (вес./вес.), которая остается стабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре (25°C), где стабильность относится к менее чем 1,5% увеличению высокомолекулярных видов в течение 12-месячного периода хранения.

В некоторых вариантах реализации лиофилизированная композиция содержит  $\geq 0,5$  вес.% воды,  $\geq 0,6$  вес.% воды,  $\geq 0,7$  вес.% воды,  $\geq 0,8$  вес.% воды,  $\geq 0,9$  вес.% воды,  $\geq 1$  вес.% воды  $\geq 1,5$  вес.% воды,  $\geq 2$

вес.% воды,  $\geq 2,5$  вес.% воды,  $\geq 3$  вес.% воды,  $\geq 3,5$  вес.% воды,  $\geq 4$  вес.% воды,  $\geq 4,5$  вес.% воды,  $\geq 5$  вес.% воды,  $\geq 5,5$  вес.% воды,  $\geq 6$  вес.% воды,  $\geq 6,5$  вес.% воды,  $\geq 7$  вес.% воды,  $\geq 7,5$  вес.% воды,  $\geq 8$  вес.% воды,  $\geq 8,5$  вес.% воды,  $\geq 9$  вес.% воды или  $\geq 9,5$  вес.% воды, но не более 10 вес.% воды. Однако экстраоптимальное количество воды может увеличить нестабильность белка. Таким образом, в некоторых вариантах реализации лиофилизированная композиция содержит  $\leq 10$  вес.% воды,  $\leq 9,5$  вес.% воды,  $\leq 9$  вес.% воды,  $\leq 8,5$  вес.% воды,  $\leq 8$  вес.% воды,  $\leq 7,5$  вес.% воды,  $\leq 7$  вес.% воды,  $\leq 6,5$  вес.% воды,  $\leq 6$  вес.% воды,  $\leq 5,5$  вес.% воды,  $\leq 5$  вес.% воды,  $\leq 4,5$  вес.% воды,  $\leq 4$  вес.% воды,  $\leq 3,5$  вес.% воды,  $\leq 3$  вес.% воды,  $\leq 2,5$  вес.% воды,  $\leq 2$  вес.% воды,  $\leq 1,5$  вес.% воды,  $\leq 1$  вес.% воды,  $\leq 0,9$  вес.% воды,  $\leq 0,8$  вес.% воды,  $\leq 0,7$  вес.% воды,  $\leq 0,6$  вес.% воды, но не менее 0,5 вес.% воды.

Фраза "содержание влаги" может использоваться взаимозаменяемо с "содержанием воды". Однако "содержание влаги" используется для описания содержания воды в лиофилизированном остатке, тогда как "содержание воды" используется для описания количества воды в водном растворе, геле, другой жидкости, газе, ледяной или твердой форме композиции, такой как лиофилизированный остаток, высушенные распылением частицы и тому подобное. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 0,5% до 10 вес.%, от 1% до 10 вес.%, от 2% до 10 вес.%, от 3% до 10 вес.%, от 4% до 10 вес.%, от 5% до 10 вес.%, от 6% до 10 вес.%, от 7% до 10 вес.%, от 8% до 10 вес.%, от 9% до 10 вес.%, от 0,5% до 9 вес.%, от 0,5% до 8 вес.%, от 0,5% до 7 вес.%, от 0,5% до 6 вес.%, от 0,5% до 5 вес.%, от 0,5% до 4 вес.%, от 0,5% до 3 вес.%, от 0,5% до 2 вес.%, от 0,5% до 1 вес.%, от 1% до 2 вес.%, от 1,5% до 2,5 вес.%, от 2% до 3 вес.%, от 2,5% до 3,5 вес.%, от 3% до 4 вес.%, от 3,5% до 4,5 вес.%, от 4% до 5 вес.%, от 4,5% до 5,5 вес.%, от 5% до 6 вес.%, от 5,5% до 6,5 вес.%, от 6% до 7 вес.%, от 6,5% до 7,5 вес.%, от 7% до 8 вес.%, от 7,5% до 8,5 вес.%, от 8% до 9 вес.%, от 8,5% до 9,5 вес.%, от 9% до 10 вес.%, от 9,5% до 10 вес.% или около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% или 8 вес.%. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 3% до 6% по весу; от 3,1% до 5,9 вес.%, от 3,2% до 5,8 вес.%, от 3,3% до 5,7 вес.%, от 3,4% до 5,6 вес.%, от 3,5% до 5,5 вес.%, от 3,6% до 5,4 вес.%, от 3,7% до 5,3 вес.%, от 3,8% до 5,2 вес.%, от 3,9% до 5,1 вес.%, от 4% до 5 вес.%, от 4,1% до 4,9 вес.%, от 4,2% до 4,8 вес.%, от 4,3% до 4,7 вес.%, от 4,4% до 4,6 вес.% или около 4,5 вес.%. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 2% до 4% по весу; от 2,1% до 3,9 вес.%, от 2,2% до 3,8 вес.%, от 2,3% до 3,7 вес.%, от 2,4% до 3,6 вес.%, от 2,5% до 3,5 вес.%, от 2,6% до 3,4 вес.%, от 2,7% до 3,3 вес.%, от 2,8% до 3,2 вес.%, от 2,9% до 3,1 вес.% или около 3 вес.%.

В некоторых вариантах реализации массовое процентное содержание воды в лиофилизированном остатке составляет около 3%, около 3,1%, около 3,2%, около 3,3%, около 3,4%, около 3,5%, около 3,6%, около 3,7%, около 3,8%, около 3,9%, около 4%, около 4,1%, около 4,2%, около 4,3%, около 4,4%, около 4,5%, около 4,6%, около 4,7%, около 4,8%, около 4,9%, около 5%, около 5,1%, около 5,2%, около 5,3%, около 5,4%, около 5,5%, около 5,6%, около 5,7%, около 5,8%, около 5,9%, около 6%, около 6,1%, около 6,2%, около 6,3%, около 6,4%, около 6,5%, около 6,6%, около 6,7%, около 6,8%, около 6,9%, около 7%, около 7,1%, около 7,2%, около 7,3%, около 7,4%, около 7,5%, около 7,6%, около 7,7%, около 7,8%, около 7,9% или около 8%. В некоторых вариантах реализации содержание воды в лиофилизированном остатке составляет более 3%, но менее 10 вес.%.

Содержание воды в лиофилизированном остатке может быть определено любым одним или несколькими методами, известными в данной области. Эти методы включают гравиметрические методы, включая термогравиметрию, газовую хроматографию, спектроскопию ближнего инфракрасного диапазона, кулонометрию и метод Карла-Фишера или метод датчика относительной влажности. Некоторые из этих методов рассматриваются в J. K. Townes, "Moisture content in proteins: its effects and measurement", 705 J. Chromatography A 115-127, 1995; и Malik et al., "Analytical Options for the Measurement of Residual Moisture Content in Lyophilized Biological Materials", Am. Pharma. ред. 1 августа 2010 г.; и цитируемых в данных документах ссылок. Например, можно использовать метод потери при высушивании (LOD) (гравиметрический), в котором лиофилизированный остаток взвешивают, подвергают дополнительно нагреву для полного удаления всей воды и других летучими веществами, содержащимися в исходном материале. Потеря массы объясняется водой (и другими летучими веществами), содержащимися в исходном материале. Другим методом определения содержания воды является метод Карла-Фишера (объемный или кулонометрический), который определяет количество  $H_2O$  путем измерения степени окисления  $SO_2$  с помощью  $I_2$ , где один моль  $I_2$  является потребителем на моль  $H_2O$ . Спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона измеряет коэффициент отражения от 1100 до 2500 нм через стеклянный пузырек (стеклянная поверхность), содержащий белок, для определения содержания влаги без разрушения образца; см. Фармакопея США, XXIII Revision, USP Convention, Rockville, MD 1995, pp. 1801-1802; и Savage et. al., "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy", 26 Biologicals 119-124, 1998.

Ллиофилизированный остаток.

Ллиофилизированная композиция, содержащая белок и стабилизатор, образует твердую матрицу, также известную как "остаток" или "лиофилизированный остаток". "Фармацевтически приемлемый оста-

ток" (используется взаимозаменяемо или как "фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток") является аморфным (стеклообразным, а не кристаллическим) и имеет эстетически элегантный внешний вид. Фармацевтически приемлемый остаток не должен иметь усадку, растрескивание, частичное или полное разрушение, плавление или изменение цвета. Красный, черный, коричневый, желтый или другой окрашенный остаток обесцвечивается и является недопустимым. Идеальный остаток механически прочен и устойчив к разрушению при обработке, пористый и похожий на губку, имеет однородную текстуру и образует единое целое и равномерно белого цвета. Остаток должен быть равномерно прикреплен к стенкам пузырька и не показывать отслоение или другие признаки усадки; см. Carpenter et al., "Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice", *Pharmaceutical Research*, 14 (8):969-975, 1997.

Остаток не должен иметь визуальных дефектов из-за проблем с замерзанием, включая трубкообразную структуру; сухую пену на верхней поверхности; корку или глазирование на поверхности остатка; и горизонтальное наслоение или формирование кольца. Остаток также должен быть без видимых дефектов из-за проблем высушивания, включая усадку, когда объем остатка меньше, чем у замороженной матрицы, и признаки отслоения стенки очевидны; растрескивание, когда остаток показывает трещины в сухой матрице, и остаток не образует единого объекта; различные степени потери структуры остатка, такие как полное или частичное разрушение остатка; расплавление, где остаток содержит кольцо растворенного материала в нижней области; частичное расплавление, где только небольшая область в основании остатка содержит растворенный материал; и потемнение, которое является желтым или коричневым обесцвечиванием остатка из-за включения восстанавливающего сахара, который подвергся реакции Майяра. Расплавление является особенно проблематичным, поскольку оно может привести к замедлению времени растворения, агрегации белка, деградации и потере активности; см. FDA, "Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterals (7/93). Finished product inspection. Last update 2009" 2009, последнее обращение 7/8/2016 по адресу <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074909.htm>.

Белковое лекарственное вещество.

Термин "белок" означает любой аминокислотный полимер, имеющий более чем около 50 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или несколько аминокислотных полимерных цепей, обычно известных в данной области как "полипептиды". Белок может содержать один или несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. "Полипептиды" обычно содержат более 50 аминокислот, тогда как "пептиды" обычно содержат 50 аминокислот или менее. Белки могут содержать одну или несколько ковалентных и нековалентных модификаций. Дисульфидные мостики (то есть между остатками цистеина с образованием цистина) могут присутствовать в некоторых белках. Эти ковалентные связи могут находиться внутри одной полипептидной цепи или между двумя отдельными полипептидными цепями. Например, дисульфидные мостики необходимы для правильной структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и тому подобного. О недавнем обзоре образования дисульфидных связей см. Oka and Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013).

В дополнение к образованию дисульфидной связи белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Эти модификации включают липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование якорей гликозилфосфатидилинозитола (GPI)), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, присоединение гликозильных групп к аргинину, аспаргину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану) и фосфорилирование (т.е. присоединение фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Для недавнего обзора посттрансляционной модификации белков, продуцируемых у эукариот, см. Mowen and David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling", 15(6) *Nat Immunol* 512-20 (2014); и Blixt and Westerland, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)", 18 *Curr Opin Chem Biol*. 62-9 (2014).

Иммуноглобулины (или "антитела") являются примерами белков, имеющих множественные полипептидные цепи и обширные посттрансляционные модификации. Канонический белок иммуноглобулина (например, IgG) содержит четыре полипептидные цепи, две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через цистиновую дисульфидную связь, и две тяжелые цепи связаны друг с другом через две цистиновые дисульфидные связи. Иммуноглобулины, продуцируемые в системах млекопитающих, также гликозилированы в различных остатках (например, в остатках аспарагина) различными полисахаридами и могут различаться у разных видов, что может влиять на антигенность терапевтических антител (см. Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering", 30 *Curr Opin Biotech* 107-112 (2014)).

Используемый в данном документе термин "белок" включает терапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и Fc-слитые белки других рецепторов, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, антитела человека, биспецифические антитела, фрагменты антител, нанотела, рекомбинантные химерные антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и тому подобное. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования рекомбинантных клеток, таких как система бакуловируса насекомых, дрожжевые системы (например,

*Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Для недавнего обзора, обсуждающего терапевтические белки и их производство, см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation", 28 *Biotechnol Genet Eng Rev.* 147-75 (2012).

Некоторые рекомбинантные Fc-содержащие белки содержат рецепторы или фрагменты рецепторов, лиганды или фрагменты лигандов, которые имеют родственных партнеров по связыванию в биологических системах. "Рецепторные Fc-слитые белки" относятся к рекомбинантным молекулам, которые содержат растворимый рецептор, слитый с Fc-доменом иммуноглобулина. Некоторые Fc-слитые белки рецептора могут содержать лиганд-связывающие домены множества различных рецепторов. Эти рецепторные Fc-слитые белки известны как "ловушки" или "молекулы ловушки". Рилоноцепт и афлиберцепт являются примерами рыночных ловушек, которые противодействуют IL1R (см. патент США № 7927583) и VEGF (см. патент США № 7087411), соответственно. Другие рекомбинантные Fc-содержащие белки включают те рекомбинантные белки, которые содержат пептид, слитый с Fc-доменом, например технология Centocor MIMETIBODY™.

Рекомбинантные Fc-содержащие белки описаны в С. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology", 20(6) *Curr. Opin. Biotechnol.* 692-9 (2009).

"Fc-слитые белки" включают часть или все два или более белков, один из которых является частью Fc молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в своем естественном состоянии. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, риноалцепт, который содержит лигандную связывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; например, SEQ ID NO: 1; см. патенты США № 7087411 и 7279159, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах реализации белок включен в предварительно лиофилизированный водный раствор в концентрации более 40 мг/мл. В некоторых вариантах реализации предварительно лиофилизированный водный раствор содержит белок в концентрации от около 50 мг/мл до около 250 мг/мл; от около 100 мг/мл до около 200 мг/мл; от около 125 мг/мл до около 175 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, предварительно лиофилизированный водный раствор содержит белок в концентрации от около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл, около 100 мг/мл, около 105 мг/мл, около 110 мг/мл, около 115 мг/мл, около 120 мг/мл, около 125 мг/мл, около 130 мг/мл, около 135 мг/мл, около 140 мг/мл, около 145 мг/мл, около 150 мг/мл, около 155 мг/мл, около 160 мг/мл, около 165 мг/мл, около 170 мг/мл, около 175 мг/мл, около 180 мг/мл, около 185 мг/мл, около 190 мг/мл, около 195 мг/мл или около 200 мг/мл.

#### Контейнеры.

В некоторых вариантах реализации предварительно лиофилизированный водный раствор, содержащий терапевтический белок, содержится в контейнере. Процесс сублимационной сушки применяется к раствору в вентилируемом контейнере, который впоследствии закрывается для хранения лиофилизованной композиции. Термин "контейнер" применяется в данном документе очень широко. Контейнер, например, может представлять собой контейнер для сыпучих веществ, такой как бутылка, банка или канистра, вмещающая от 2 мл до четырех литров или более, ампула, пузырек (стеклянный или пластиковый), шприц (стеклянный или пластиковый), картридж или автоинжектор. Пузырек может быть размером не более 0,2 мл или не более 100 мл. Типичные пузырьки могут быть изготовлены из прозрачного или янтарного стекла, боросиликатного стекла типа I, содосиликатного стекла типа II или содосиликатного стекла типа III. Пузырек может быть закрыт пробкой, крышкой, откидной крышкой или винтовой крышкой.

Трубчатое стекло в стиле SCHOTT® особенно полезно при лиофилизации.

С появлением биологических препаратов и самостоятельного введения пациентами инъекционных препаратов автоинжекторы стали более важным контейнером для лекарственного продукта. Самостоятельное введение лиофилизованного лекарственного продукта требует, чтобы пациент восстанавливал лиофилизированный остаток стерильной водой для инъекций или другим стерильным растворителем. Чтобы обеспечить стерильное восстановление, контроль объема, простоту обращения и общее упрощение, можно использовать предварительно заполненные шприцы с двумя или несколькими камерами. Двухкамерные автоинжекторы или другие предварительно заполненные шприцы содержат лиофилизированный лекарственный продукт в одной камере и предварительно отмеренное количество разбавителя или жидкой фармацевтической композиции в другой камере. Пример двухкамерных инжекторов образца описан в US 6149626 A, выданном 21 ноября 2006 г., и US 7959600 B2, выданном 14 июня 2011 г.

#### Стабильность белка.

Леофилизованная форма белка обеспечивает несколько преимуществ, одним из которых является сохранение стабильности белка с течением времени, особенно в течение по меньшей мере 18 месяцев

при комнатной температуре. "Комнатная температура" относится к температуре обычной рабочей среды. Температура в помещении включает температуры в диапазоне 10-40°C, 17-27°C, 20-24°C, 25°C±3°C, 25°C±2°C, 25°C±1°C или около 25°C. Фраза "комнатная температура" может использоваться взаимозаменяемо с фразой "температура окружающей среды". Комнатная температура включает в себя "контролируемую комнатную температуру", которая указывает на температуру обычной рабочей среды от 20 до 25°C с кратковременными отклонениями (перепадами) от 15° до 30°, что может наблюдаться в аптеках, больницах и на складах. "Контролируемая комнатная температура" включает в себя расчетную среднюю кинетическую температуру не более 25° (см. The Pharmacopeia of the United States of America, Thirty-Third Revision and the National Formulary, Twenty-Eighth Edition, USP 33-NF 28 Reissue, General Notices and Requirements, "Applying to Standards, Tests, Assays, and Other Specifications of the United States Pharmacopeia", 10.30 Storage Temperature and Humidity, May 1, 2010, available at [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/USP33-NF28-ReissueGeneralNotices.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/USP33-NF28-ReissueGeneralNotices.pdf), last accessed July 8, 2016).

Термин "стабильность" относится к сохранению приемлемой степени физической структуры (термодинамическая и коллоидная стабильность), химической структуры (кинетическая стабильность) или биологической функции (функциональная стабильность) белка после хранения в соответствующей среде или при определенных условиях. Белок может быть стабильным, даже если он не сохраняет 100% своей физической структуры, химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. В данном документе, например, лиофилизированный белок считается стабильным, когда не более 2% количества белка присутствует в высокомолекулярной форме после хранения при комнатной температуре в течение до 24 месяцев. В некоторых вариантах реализации лиофилизированная или иная твердая форма белка считается стабильной, когда около 3%, около 2,9%, около 2,8%, около 2,7%, около 2,6%, около 2,5%, около 2,4%, около 2,3%, около 2,2%, около 2,1%, около 2%, около 1,9%, около 1,8%, около 1,7%, около 1,6%, около 1,5%, около 1,4%, около 1,3%, около 1,2%, около 1,1%, около 1,0%, около 0,9%, около 0,8%, около 0,7%, около 0,6%, около 0,5%, около 0,4%, около 0,3%, около 0,2% или около 0,1% или менее белка находится в высокомолекулярной форме после хранения при комнатной температуре в течение около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 12 месяцев, около 13 месяцев, около 14 месяцев, около 15 месяцев, около 16 месяцев, около 17 месяцев, около 18 месяцев, около 19 месяцев, около 20 месяцев, около 21 месяца, около 22 месяцев, около 23 месяцев, около 24 месяцев, около 36 месяцев или более 18 месяцев.

В данном документе лиофилизированная или другая твердая форма белка считается "нестабильной" при комнатной температуре, если процентное изменение у высокомолекулярных частиц составляет более около 0,5%, более около 0,6%, более около 0,7%, более около 0,8% или более около 0,9% в течение первого месяца хранения при комнатной температуре. Таким образом, лиофилизированная или другая твердая форма белка с процентным увеличением у высокомолекулярных видов ≤0,5% в течение первого месяца хранения при комнатной температуре может рассматриваться как стабильная.

Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентного содержания нативной молекулы, которая остается в композиции после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре или после доставки пациенту. Процент белка, который сохраняет свою нативную форму (например, часть нативных видов по отношению ко всему белку, включая высокомолекулярные и низкомолекулярные виды), может быть определена, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-HPLC]). В случае лиофилизированного белка, остаток сначала сольбилизируется и затем белок подвергается тестированию. Нативный белок включает белок, который не агрегируется или иным образом не деградирует. В определенных вариантах реализации по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы белка можно обнаружить в лиофилизированном остатке после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. Более 80% белка в лиофилизированном остатке должно быть в его нативной форме и предпочтительно более 90%. Определенное количество времени, после которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев, по меньшей мере 14 месяцев, по меньшей мере 15 месяцев, по меньшей мере 16 месяцев, по меньшей мере 17 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 19 месяцев, по меньшей мере 20 месяцев, по меньшей мере 21 месяц, по меньшей мере 22 месяца, по меньшей мере 23 месяца, по меньшей мере 24 месяца или более. Температура, при которой образцы могут храниться при оценке стабильности, может быть любой температурой от около -80°C до около 50°C, например, при хранении при около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C или другие комнатные температуры, около 35°C, около 37°C или другие физиологические температуры, около 45°C или около 50°C.

Стабильность может быть измерена, помимо прочего, путем определения процентного содержания белка, который образует агрегат (то есть высокомолекулярные виды, то есть виды HMW) в лиофилизированном остатке через определенное количество времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна проценту высокомолекулярных (HMW) видов, которые образуются. Процент HMW-видов белка может быть определен, помимо прочего, методом эксклюзионной хроматографии после солиubilизации, как описано выше. Лيوфилизированная белковая композиция также может считаться стабильной, если через три месяца при комнатной температуре менее чем около 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% белка обнаружено в форме HMW.

Стабильность может быть измерена путем определения процентного содержания белка, который деградирует или иным образом обнаруживается в виде низкомолекулярных (LMW) частиц в лиофилизированном остатке после определенного количества времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна проценту LMW видов, обнаруженных в солиubilизированном лиофилизированном остатке. Процент LMW видов белка может быть определен методом эксклюзионной хроматографии, как описано выше. Белковый лиофилизированный остаток также может считаться стабильным, если через три месяца при комнатной температуре менее 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% первой молекулы обнаружен в LMW форме.

Другие методы могут быть использованы для оценки стабильности лиофилизированного белка, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термостабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и поглощение при около 350 нм или около 405 нм для определения мутности раствора. Например, композицию данного изобретения можно считать стабильной, если после 6 или более месяцев хранения при температуре от около 5°C до около 25°C изменение OD<sub>405</sub> композиции составляет менее чем около 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) от OD<sub>405</sub> состава в нулевое время.

Стабильность также можно оценивать путем измерения биологической активности, физиологической активности или аффинности связывания антитела или другого белка с его мишенью. Например, лиофилизированное антитело может считаться стабильным, если после хранения, например, при 5°C, 25°C, 37°C, 45°C, 50°C и т.д. в течение определенного периода времени (например, до 1 месяца, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев и т.д.), антитело, содержащееся в лиофилизированной композиции, связывается со своим родственным эпитоп-содержащим антигеном с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 50%, 95% или более от аффинности связывания антитела до указанной лиофилизации и хранения. Аффинность связывания может быть определена, например, с помощью ELISA или плазмонного резонанса. Биологическую активность можно определить с помощью анализа активности антител, растворимого рецептора или лиганда, такого как, например, контактирование клетки, которая экспрессирует родственного связывающего партнера, с восстановленной композицией, содержащей антитело, растворимый рецептор или лиганд. Связывание антитела, растворимого рецептора или лиганда с такой клеткой может быть измерено непосредственно, например, с помощью анализа FACS. Белок может считаться "стабильным", когда биологическая или физиологическая специфическая активность (т.е. эффективность) белка составляет по меньшей мере 50% от его начальной (T<sub>0</sub>) эффективности после хранения при комнатной температуре в течение по меньшей мере 18 месяцев. Стабильный белок сохраняет эффективность не менее 51%, эффективность не менее 52%, эффективность не менее 53%, эффективность не менее 54%, эффективность не менее 55%, эффективность не менее 56%, эффективность не менее 57%, эффективность не менее 58%, эффективность не менее 59%, эффективность не менее 60%, эффективность не менее 61%, эффективность не менее 62%, эффективность не менее 63%, эффективность не менее 64%, эффективность не менее 65%, эффективность не менее 66%, эффективность не менее 67%, эффективность не менее 68%, эффективность не менее 69%, эффективность не менее 70%, эффективность не менее 71%, эффективность не менее 72%, эффективность не менее 73%, эффективность не менее 74%, эффективность не менее 75%, эффективность не менее 76%, эффективность не менее 77%, эффективность не менее 78%, эффективность не менее 79%, эффективность не менее 80%, эффективность не менее 81%, эффективность не менее 82%, эффективность не менее 83%, эффективность не менее 84%, эффективность не менее 85%, эффективность не менее 86%, эффективность не менее 87%, эффективность не менее 88%, эффективность не менее 89%, эффективность не менее 90%, эффективность не менее 91%, эффективность не менее 92%, эффективность не менее 93%, эффективность не менее 94%, эффективность не менее 95%, эффективность не менее 96%, эффективность не менее 97%, эффективность не менее 98% или эффективность не менее 99% после хранения до 12 месяцев, до 13 месяцев, до 14 месяцев, до 15 месяцев, до 16 месяцев, до 17 месяцев, до 18 месяцев, до 19 месяцев, до 20 месяцев, до 21 месяца, до 22 месяцев, до 23 месяцев или до 24 месяцев при комнатной температуре.

"Стабильный" белок практически не претерпевает изменений в структуре или специфической активности после хранения при комнатной температуре в течение длительного периода времени, например до 18 месяцев. Изменения в структуре включают образование агрегатов или других высокомолекулярных форм белка, деградацию белка, такую как гидролиз пептидных связей, и химическую деградацию, такую как дезамидирование, асалилирование и тому подобное. Например, обычной формой деградации антител является образование агрегатов, которые включают обратимые димеры и тримеры, а также более стабильные и менее обратимые тетрамеры и мультимеры более высокого порядка. "Необратимые агрега-

ты" представляют собой подгруппу агрегатов, которые тяжело солибилизируют или не связываются при восстановлении лиофилизированного остатка. "Стабильный" белок подвергается увеличению образования высокомолекулярных частиц, которое составляет менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%, менее 11%, менее 10%, менее чем 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1% или менее 0,5% во время хранения при комнатной температуре до 7 месяцев, до 8 месяцев, до 9 месяцев, до 10 месяцев, до 11 месяцев, до 12 месяцев, до 13 месяцев, до 14 месяцев, до 15 месяцев, до 16 месяцев, до 17 месяцев, до 18 месяцев, до 19 месяцев, до 20 месяцев, до 21 месяца, до 22 месяцев, до 23 месяцев или до 24 месяцев. Методы обнаружения высокомолекулярных видов могут иметь вариабельность обнаружения от 0,2 до 0,3%.

Зависящая от температуры скорость агрегации белка или другого образования высокомолекулярных частиц следует за кинетикой Аррениуса или модифицированной кинетикой Аррениуса (слегка изогнутые графики Аррениуса) (см., например, Chakroun et al., "Mapping the Aggregation Kinetics of a Therapeutic Antibody Fragment", *Mol. Pharmaceut.* 13: 307-319 (2016)). Таким образом, скорости агрегации и процентное изменение в высокомолекулярных частицах при данной температуре для данной композиции со временем могут быть предсказаны на основе квадратного корня во временной зависимости и кинетики Аррениуса или модифицированной кинетики Аррениуса. Например, лиофилизированные образцы инкубируют при заданной температуре (например, 5°C, 25°C, 37°C, 50°C) в запечатанных стеклянных пузырьках. Аликвоты отбирают через равные промежутки времени, удаляют нерастворимые агрегаты и затем подвергают SE-HPLC. Наблюдаемые скорости агрегации определяются непосредственно из линейного соответствия, зависящего от времени, основного пика в зависимости от площади пика HPLC. Прогнозы процентного изменения у высокомолекулярных частиц затем делаются путем применения квадратного корня в законе скорости времени и кинетике Аррениуса к данным. Например, наблюдаемая константа скорости при различных температурах затем подгоняется к уравнению Аррениуса:  $\ln k = \ln A - (E/RT)$ , где E - энергия активации (в кал/моль), R - универсальная газовая постоянная (1,987 кал/моль/К), T - абсолютная температура (в Кельвинах) и ln A - постоянная температуры, которая включает такие факторы, как частота столкновений. Значение k экстраполируется из аппроксимации Аррениуса, чтобы предсказать изменение высокомолекулярных частиц при данной температуре (например, 25°C) во времени (например, 24 месяца).

#### Ллиофилизация.

Способы ллиофилизации белков в целом и терапевтических антител или других антигенсвязывающих белков, в частности, хорошо известны в данной области. Вкратце, в одном варианте реализации, ллиофилизация начинается с предварительно ллиофилизированного водного раствора, содержащего лекарственное вещество и наполнители, как описано выше. Предварительно ллиофилизированный водный раствор помещают в открытый контейнер (например, пузырек) и открытый контейнер помещают в камеру ллиофилизации на полку. Процесс ллиофилизации включает три основных стадии: (1) замораживание с необязательными циклами отжига, (2) первичная сушка и (3) вторичная сушка с необязательной стадией отжига после сушки. Первая стадия замораживания. На данной стадии температура полки понижается для охлаждения препарата в пузырьке. Внутри композиции образуются ледяные кристаллы и остальная часть композиции становится более концентрированной и вязкой. Концентрированный остаток затвердевает с образованием аморфного, кристаллического или комбинированного кристаллического/аморфного состояния. В одном варианте реализации остаток затвердевает в аморфном стеклообразном состоянии.

В некоторых методиках ллиофилизации, замороженную композицию подвергают отжигу для усиления кристаллизации. Твердый остаток выдерживают при температуре выше конечной температуры заморзания в течение некоторого периода времени для кристаллизации некоторых компонентов, таких как наполнители, такие как маннитол и глицин.

Лед затем удаляется сублимацией. Давление в камере ллиофилизации (например, 40-400 Торр) и температура полки (-30°C - +10°C) устанавливаются ниже тройной точки воды. Температура поддерживается ниже температуры стеклования ( $T_g$ ) для аморфных остатков, чтобы предотвратить разрушение структуры остатка.

Некоторое количество воды может оставаться в матрице после стадии первичной сушки. Оставшаяся вода удаляется в процессе десорбции на стадии вторичной сушки. На данной стадии, температура полки увеличивается для ускорения десорбции и достижения оптимального содержания влаги в ллиофилизированном продукте. В одном варианте реализации конечное содержание влаги составляет не менее около 0,5% и не более около 10%. В другом варианте реализации конечное содержание влаги составляет не менее около 3% и не более около 6%. В специфическом варианте реализации содержание влаги составляет более 3%, но менее 4%. В другом специфическом варианте реализации содержание влаги составляет около 3%. В другом специфическом варианте реализации, содержание влаги составляет около 4%. В другом специфическом варианте реализации, содержание влаги составляет около 4%. В еще одном специфическом варианте реализации содержание влаги составляет около 6%.

В одном варианте реализации ллиофилизированный продукт ("лиофилизированный остаток") подвергается стадии отжига после стадии вторичной сушки. Отжиг после стадии сушки также называют фи-

зическим старением или структурной релаксацией. Эта стадия отжига после сушки способствует релаксации аморфной матрицы к равновесному стеклообразному состоянию (альфа-релаксация), увеличению времени структурной релаксации при температуре хранения, снижению подвижности в стеклообразном состоянии, вероятно, понижению белка до более стабильного энергетического состояния, тем самым оптимизируя стабильность белка. В данном документе стадия отжига кратковременно ускоряет молекулярную подвижность, чтобы обеспечить общее снижение энтропии стеклообразного состояния и вращательных форм белка.

После стадии отжига, число случайных термодинамических молекулярных стеклообразных состояний сводится к минимуму и равновесие стекла максимизируется. В некоторых вариантах реализации температура отжига ниже  $T_g$  продукта. В некоторых вариантах реализации температура отжига составляет от 25°C до около 90°C, от 25°C до около 80°C, от 25°C до около 75°C, от около 25°C до около 70°C, от 35°C до около 70°C, от 40°C до около 70°C, от 30°C до около 55°C, от 50°C до около 60°C, от 55°C до около 65°C, от 60°C до около 70°C, от 65°C до около 75°C, от 70°C до около 80°C или от 75°C до около 85°C. В некоторых вариантах реализации температура отжига составляет около 90°C, около 80°C, около 79°C, около 78°C, около 77°C, около 76°C, около 75°C, около 74°C, около 73°C, около 72°C, около 71°C, около 70°C, около 69°C, около 68°C, около 67°C, около 66°C, около 65°C, около 64°C, около 63°C, около 62°C, около 61°C, около 60°C, около 59°C, около 58°C, около 57°C, около 56°C, около 57°C, около 56°C, около 55°C, около 54°C, около 53°C, около 52°C, около 51°C, около 50°C, около 49°C, около 48°C, около 47°C, около 46°C, около 45°C, около 44°C, около 43°C, около 42°C, около 41°C, около 40°C, около 39°C, около 38°C, около 37°C, около 36°C, около 35°C, около 34°C, около 33°C, около 32°C, около 31°C, около 30°C, около 29°C, около 28°C, около 27°C, около 26°C или 25°C. В специфическом варианте реализации температура отжига выше 25°C. В другом специфическом варианте реализации температура отжига выше 50°C.

Лиофилизированный остаток выдерживают при температуре отжига в течение периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможным релаксацию структуры остатка, что определяется восстановлением энтропии из ДСК или изотермической калориметрии. В некоторых вариантах реализации температуру отжига поддерживают от около 12 ч до около двух недель, от около 12 ч до одной недели, от около 12 ч до около нескольких дней, от около 18 ч до около 72 ч, от около 24 ч до около 36 ч, от около 30 ч до около 42 ч, от около 36 ч до около 48 ч, от около 42 ч до около 54 ч, от около 48 ч до около 60 ч, от около 54 ч до около 66 ч, от около 60 ч до около 72 ч, от около 66 ч до около 78 ч или от около 72 ч до около 84 ч. В некоторых вариантах реализации температуру отжига поддерживают в течение около 12 ч, около 13 ч, около 14 ч, около 15 ч, около 16 ч, около 17 ч, около 18 ч, около 19 ч, около 20 ч, около 21 ч, около 22 ч, около 23 ч, около 24 ч, около 25 ч, около 26 ч, около 27 ч, около 28 ч, около 29 часов, около 30 ч, около 31 часа, около 32 ч, около 33 ч, около 34 ч, около 35 ч, около 36 ч, около 37 ч, около 38 ч, около 39 ч, около 40 ч, около 41 ч, около 42 ч, около 43 ч, около 44 ч, около 45 ч, около 46 ч, около 47 ч, около 48 ч, около 49 ч, около 50 ч, около 51 ч, около 52 ч, около 53 ч, около 54 ч, около 55 ч, около 56 ч, около 57 ч, около 58 ч, около 59 ч, около 60 ч, около 61 ч, около 62 ч, около 63 ч, около 64 ч, около 65 ч, около 66 ч, около 67 ч, около 68 ч, около 69 ч, около 70 ч, около 71 ч, около 72 ч, около 73 ч, около 74 ч, около 75 ч, около 76 ч, около 77 ч, около 78 ч, около 79 ч, около 80 ч, около 81 ч, около 82 ч, около 83 ч или около 84 ч.

В специфическом варианте реализации температура отжига выше 50°C, которая поддерживается в течение примерно 72 ч. В другом специфическом варианте реализации температура отжига составляет около 25°C, которая поддерживается в течение около 72 ч.

В одном варианте реализации условия отжига определяются экспериментально путем проведения стадии отжига после сушки в дифференциальном сканирующем калориметре. Эндотермическая область температурной кривой обычно возникает сразу после эффекта отжига, что позволяет практикующему врачу выбрать температуру отжига; см. Sartor et al., "Calorimetric Studies of the Kinetic Unfreezing of Molecular Motions in Hydrated Lysozyme, Hemoglobin, and Myoglobin", 66 Biophysical J. 249-258 (1994).

### Примеры

Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное описание того, как получать и применять способы и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количества, размеров и тому подобное), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

Пример 1. Методика лиофилизации.

Водный раствор для предварительной лиофилизации, содержащий антитело и наполнители (как описано в данном документе), загружали в пузырьки из боросиликатного стекла типа I. Заполненный пузырек помещали в лиофилизатор LYOSTAR 3 (SP Scientific, Warminster, PA). Камеру закрывали и температуру полки снижали до 5°C. Образец выдерживали при 5°C в течение 30 мин до замораживания. Скорость изменения при замораживании составляла 0,5°C/мин. Температуру полки выдерживали при -45°C в течение 60 мин.

Первичную сушку выполняли при заданном значении вакуума около 100 мТорр и температуре полки около -25°C, что достигалось при скорости изменения нагрева около 0,5°C/мин в течение около 50 ч.

Вторичная сушка проводилась при 35°C, которая была достигнута при скорости изменения для нагревания около 0,3°C/мин. Вторичная сушка продолжалась около 6 ч.

После вторичной сушки камеру заполняли газообразным азотом до давления около 0,8 атмосфер (около 608000 мТорр) и пузырек закупоривали бутилкаучуковой пробкой для лиофилизации 4432/50 с покрытием Flurotec®.

Пример 2. Стабильность белка в зависимости от содержания влаги.

Молекулы воды могут служить пластификатором и стабилизатором в лиофилизированном продукте. Вода пригодна в качестве пластификатора из-за ее небольшого размера и способности образовывать водородные связи с другими молекулами воды и другими молекулами (такими как молекулы белка). Преимущество использования воды в качестве стабилизатора/пластификатора заключается в том, что соотношение стабилизатора (воды) к белку может быть увеличено без влияния на тоничность восстановленной композиции. Содержание влаги можно регулировать путем проектирования процесса лиофилизации. Содержание влаги в лиофилизированных остатках определяли анализатором влажности Computrac® Vapor Pro® (Arizona Instrument LLC, Chandler, AZ).

Рекомбинантные моноклональные антитела (mAb1, mAb2, mAb3) продуцировались в клетках EESYR® (см. патент США № 7771997 B2, выданный 10 августа 2010 г.) и образовывались в концентрации 150 мг/мл в 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 5% сахарозы и 1,54% аргинина (все мас./об.% в предварительно лиофилизированной жидкой композиции). Жидкую композицию лиофилизировали, как описано выше, до специфических уровней содержания влаги (вес./вес.%) и хранили при 50°C, 37°C или 25°C в течение определенного времени. После хранения лиофилизированные композиции восстанавливали водой и подвергали эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого разрешения (SE-HPLC). Высокомолекулярные виды (HMW) были обнаружены, интегрированы и сравнены с контролями при T=0. Процентное изменение HMW видов как части общего белка было рассчитано и представлено в табл. 1. Леофилизированный 150 мг/мл mAb1 был наиболее стабильным с содержанием влаги около 4,5% при хранении при 25°C.

Было предсказано, что лиофилизированные композиции mAb1, имеющие влажность 3-10%, деградируют ~2,0% после 24 месяцев хранения при 25°C. Алгоритмы кинетики Аррениуса были применены к измеренным скоростям деградации и прогнозы, основанные на квадратном корне в законе скорости времени, составляли не менее 24 месяцев. Процентное изменение HMW видов для каждой точки содержания влаги приведено в табл. 2. Предварительно лиофилизированная водная композиция содержит 150 мг/мл mAb1, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 5% сахарозы, 1,54% аргинина.

Пример 3. Эффект отжига после сушки.

Стабильность белка была улучшена путем отжига лиофилизированного лекарственного продукта. Предполагается, что отжиг лиофилизированной композиции ниже температуры стеклования приводит к релаксации аморфных молекул до более низкого энергетического состояния с получением более стабильного продукта. Отжиг лиофилизированной композиции в течение 72 ч при 70°C привел к более низкому наблюдаемому увеличению %HMW для 150 мг/мл mAb1, лиофилизированного с 10% сахарозы и 3,08% аргинина (предварительно лиофилизированная композиция: 150 мг/мл mAb1, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 10% сахарозы, 3,08% аргинина). Изменение в процентах HMW видов антител приведено в табл. 3 для отожженных и неотожженных композиций, хранящихся в течение 6 месяцев при 25°C, 37°C и 50°C.

Таблица 1

Процент увеличения в высокомолекулярных видах

Температура °C		50			37			25			
Время (месяцы)		0,5	1	2	1	3	6	1	3	6	
%	0	3,6	5,16	7,79	1,72	3,37	5,0	0,55	1,19	1,8	
	0,5	3,1	4,42	6,84	1,48	2,91	4,3	0,51	1,02	1,6	
	1,5	2,4	3,56	5,54	1,07	2,19	3,3	0,31	0,7	1,1	
	3,0	2,3	3,38	5,46	0,88	1,77	2,9	0,26	0,55	0,9	
	H <sub>2</sub> O	4,5	2,7	3,77	6,18	0,91	1,86	2,9	0,22	0,46	0,7
		6,0	2,1	4,6	7,75	0,9	2,33	HO	0,1	0,63	HO
		8,0	2,9	5,8	10,67	1,4	2,98	HO	0,2	0,92	HO
		10	3,6	7,0	13,29	1,8	4,14	HO	0,4	1,16	HO

Таблица 2

Прогноз деградации при 25°C 150 мг/мл  
лиофилизированного mAb1 - Δ%НМВ видов

Время H <sub>2</sub> O	1 мес	3 мес	6 мес	9 мес	12 мес	18 мес	24 мес
0%	0,77	1,33	1,89	2,31	2,67	3,24	3,77
0,5%	0,66	1,14	1,61	1,97	2,27	2,78	3,21
1,5%	0,47	0,82	1,16	1,42	1,64	2,01	2,32
3,0%	0,36	0,63	0,89	1,09	1,26	1,54	1,78
4,5%	0,31	0,55	0,77	0,94	1,09	1,34	1,54
6,0%	0,34	0,60	0,84	1,03	1,19	1,46	1,69
8,0%	0,49	0,85	1,20	1,47	1,70	2,08	2,41
10%	0,64	1,11	1,58	1,93	2,23	2,73	3,15

Алгоритмы кинетики Аррениуса были применены к измеренным скоростям деградации и проекции, основанные на значении квадратного корня в законе скорость от времени, составляли не менее 24 месяцев для отожженных образцов по сравнению с неотожженными образцами, хранящимися при 37°C. Прогнозируется, что отжиг даст примерно на 20% меньше НМВ видов, чем в неотожженном образце через 24 месяца (т.е. 5,76% против 6,05% Δ%НМВ).

Таблица 3

## Δ%НМВ с отжигом против без отжига

Температура	Отжиг	Без отжига
25°C	0,2%	0,6%
37°C	0,5%	1,5%
50°C	0,8%	2,1%

Пример 4. Влияние отдельных наполнителей на стабильность.

Специфические стабилизаторы, включая сахара, полиолы, соли и аминокислоты, оценивали по их индивидуальной способности стабилизировать лиофилизированное антитело.

Лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 был наиболее стабильным при введении в состав сахарозы (см. табл. 4). T<sub>g</sub> композиции сахарозы достаточно высока (~110°C) для хранения при комнатной температуре и обеспечивает достаточную широту для добавления пластификатора, если необходимо.

Пример 5. Влияние комбинации трегалозы на стабильность.

Комбинирование трегалозы или сахарозы с пластификаторами, такими как сорбитол или маннитол, неожиданно привело к получению более стабильной композиции при комнатной температуре. Комбинации сорбитола и трегалозы стабилизировали лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 больше, чем одна трегалоза. Основная предварительно лиофилизированная композиция содержала mAb1 150 мг/мл, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, к которому были добавлены различные комбинации трегалозы и сорбитола до лиофилизации. Стабильность лиофилизированного белка в комбинации с трегалозой и/или сорбитолом была представлена в таблице как Δ%НМВ в табл. 5.

Таблица 4

## Влияние отдельных наполнителей на mAb1 Δ%НМВ

	50°C @ 0,5 мес.	50°C @ 1 мес.	50°C @ 2 мес.	25°C @ 4 мес.
Нет стабилизатора	23,74	32,33	43,76	11,04
10% сахарозы	2,68	4,12	6,24	0,87
10% трегалозы	4,02	5,98	8,9	1,66
3,36% пролина	9,08	13,48	19,52	3,79
5,32% сорбитол	8,29	12,45	18,32	1,83
5,32% маннитол	4,98	7,61	11,58	1,4
2,19% глицина	8,57	12,3	18,63	3,28
0,85% NaCl	8,43	11,54	17,95	2,28
2,69% глицерина	12,86	17,34	25,91	4,49
3,08% аргинина	6,66	10,06	14,86	2,95
2,60% аланина	9,84	14,58	22,23	4,03

Таблица 5

Влияние трегалозы и/или сорбитола на mAb1  $\Delta\%HMW$ 

	Комбинация стабилизатора			
	10% трегалозы	6,66% трегалозы, 1,77% сорбитола	5% трегалозы, 2,66% сорбитола	3,88% трегалозы, 3,55% сорбитола
25°C (6 месяцев)	2,0%	1,8%	1,8%	1,8%
37°C (6 месяцев)	5,4%	5,0%	5,1%	5,6%
50°C (6 месяцев)	8,1%	7,9%	8,5%	9,8%
25°C (24 месяца) *	4,06%	3,43%	3,26%	3,26%

\* Проекции основаны на значении квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

Пример 6. Влияние комбинации сахарозы на стабильность.

Комбинации маннитола и сахарозы стабилизировали лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 больше, чем одна сахароза. Основная предварительно лиофилизованная композиция содержит 150 мг/мл mAb1, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, к которому были добавлены различные комбинации сахарозы и маннитола до лиофилизации. Стабильность лиофилизованного белка в комбинации с сахарозой и/или маннитолом была представлена в таблице как  $\Delta\%HMW$  в табл. 6. Комбинация маннитола и сахарозы стабилизировали лиофилизированную 150 мг/мл mAb1 больше, чем одна сахароза.

Таблица 6

Влияние сахарозы и маннитола на mAb1  $\Delta\%HMW$ 

	Комбинация стабилизатора	
	10% сахарозы	5% сахарозы, 2,66% сорбитола
25°C (6 месяцев)	1,6%	1,3%
37°C (6 месяцев)	4,0%	3,7%
50°C (2 месяца)	5,9%	7,2%
25°C (24 месяца) *	2,86%	2,52%

\* Проекции основаны на значении квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

Сахарозу объединяли с полиолами и аминокислотами для оценки способности стабилизировать лиофилизированное антитело. MAb1 150 мг/мл объединяли с сахарозой (Suc) и любым из сорбитола (Sor), глицерина (Gly), аргинина (Arg) и аланина (Ala) в различных пропорциях. Изменение HMW видов оценивали при 25°C и 5°C при различных периодах времени хранения. Результаты ( $\Delta\%HMW$ ) представлены в табл. 7. Ни одна из протестированных комбинаций наполнителей не стабилизировала лиофилизированную mAb1 150 мг/мл больше, чем одна сахароза при хранении при 25°C. Неожиданно было предсказано, что комбинация сорбитола и сахарозы улучшает стабильность по сравнению с одной сахарозой при хранении при 5°C в течение 120 месяцев и является более стабильной, чем одна сахароза.

Пример 7. Эффекты комбинации сахарозы и аргинина на стабильность лекарственного вещества.

Леофилизированный 150 мг/мл mAb1 и лиофилизированный 150 мг/мл mAb2 имеют сопоставимую стабильность при смешивании с 10% сахарозой и 3,08% аргинина. Изменение в  $\%HMW$  видов рассчитывали при 1 месяце хранения при 25°C, 37°C и 50°C. Было предсказано, что лиофилизированный mAb1 150 мг/мл и лиофилизированный mAb2 150 мг/мл (на основе квадратного корня в законе скорости и кинетики Аррениуса) будут иметь сравнимую стабильность при образовании с 10% сахарозы и 3,08% аргинина при 25°C до 24 месяцев и далее. Результаты анализа  $\Delta\%HMW$  представлены в табл. 8.

Таблица 7

Влияние других наполнителей в комбинации с сахарозой на mAb1  $\Delta\%HMW$ 

	25°C/1 мес.	25°C/3 мес.	25°C/6 мес.	* 25°C/24 мес.	* 5°C/120 мес.
10,0% сахарозы	0,47%	0,96%	1,55%	3,08%	1,18%
9,09% Suc/0,48% Sor	0,53%	1,04%	1,60%		
8,33% Suc/0,89% Sor	0,47%	0,65%	1,52%		
6,66% Suc/1,77% Sor	0,46%	0,98%	1,53%		
5,00% Suc/2,66% Sor	0,48%	1,02%	1,55%	3,08%	0,90%
9,09% Suc/0,24% Gly	0,52%	1,06%	1,66%		
8,33% Suc/0,45% Gly	0,55%	1,11%	1,72%		
6,66% Suc/0,90% Gly	0,65%	1,27%	2,05%		
5,00% Suc/1,34% Gly	0,71%	1,48%	2,32%	4,68%	1,48%
9,09% Suc/0,28% Arg	0,51%	1,02%	1,61%		
8,33% Suc/0,51% Arg	0,50%	1,03%	1,61%		
6,66% Suc/1,03% Arg	0,57%	1,14%	1,83%		
5,00% Suc/1,54% Arg	0,65%	1,35%	2,08%	4,21%	1,68%
9,09% Suc/0,24% Ala	0,50%	0,99%	1,58%		
8,33% Suc/0,43% Ala	0,54%	1,05%	1,64%		
6,66% Suc/0,87% Ala	0,65%	1,30%	1,91%		
5,00% Suc/1,30% Ala	0,72%	1,54%	2,45%	4,90%	1,79%

\* Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

Таблица 8

Влияние 10% сахарозы/3,08% аргинина на mAb1 и mAb2  $\Delta\%HMW$ 

mAb1				mAb2			
25°C (1 мес.)	37°C (1 мес.)	50°C (1 мес.)	* 25°C (24 мес.)	25°C (1 мес.)	37°C (1 мес.)	50°C (1 мес.)	* 25°C (24 мес.)
0,2%	0,5%	1,5%	0,97%	0,1%	0,5%	1,5%	0,71%

\* Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

Пример 8. Влияние соотношения стабилизатора к лекарственному продукту на стабильность лекарственного продукта.

Комбинации сахарозы и аргинина были образованы с антителами в различных пропорциях по массе, и значение  $\Delta\%HMW$  было определено в разное время при 50°C и 25°C. Предполагается, что составы лиофилизированных антител 150 мг/мл со стабилизатором  $\geq 0,87:1$  (на основе значения квадратного корня в законе скорость от времени и кинетики Аррениуса) деградируют на  $\leq 1\%$  после 24 месяцев хранения при 25°C. Результаты приведены в табл. 9.

Таблица 9

Влияние соотношения стабилизатора к белку на стабильность ( $\Delta\% \text{HMW}$ )

Сахароза/	Стабилизатор: антитело	50°C	50°C	50°C	* 25°C
Аргинин		(0,5 мес)	(1 мес)	(2 мес)	(24 мес)
5%/1,5%	0,44:1	3,7%	5,4%	8,2%	3,74%
7,5%/2,3%	0,65:1	1,9%	2,7%	4,1%	1,77%
10%/3,1%	0,87:1	1,0%	1,5%	2,3%	0,97%
12,5%/3,9%	1,1:1	0,6%	0,9%	1,3%	0,43%
15%/4,6%	1,3:1	0,4%	0,6%	0,9%	0,35%

\* Проекция основаны на значениях квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

Таблица 10

Влияние отдельных наполнителей на mAb3  $\Delta\% \text{HMW}$ 

	50°C @ 0,5 мес.	50°C @ 1 мес.	50°C @ 2 мес.	25°C @ 7 мес.
Нет стабилизатора	1,4%	2,31%	3,34%	0,78%
10% сахарозы	0,03%	0,03%	0,04%	0,04%
10% трегалозы	0,09%	0,08%	0,16%	0,23%
3,36% пролина	2,0%	2,92%	12,37%	3,25%
5,32% сорбитола	3,5%	6,24%	8,85%	1,47%
5,32% маннитола	21,55%	26,87%	30,78%	14,44%
2,19% глицина	9,67%	16,22%	24,39%	3,77%
0,85% NaCl	4,51%	6,4%	7,83%	6,27%
3,08% аргинина	0,05%	0,14%	0,09%	0,04%
2,60% аланина	18,04%	22,18%	23,68%	14,74%

Пример 9. Стабилизирующее действие наполнителей на лиофилизированный белок на низкую концентрацию белка в предварительно лиофилизированной жидкой композиции.

Специфические стабилизаторы, включая сахара, полиолы, соли и аминокислоты, оценивали по их индивидуальной способности стабилизировать лиофилизированное антитело.

Лиофилизированный 2 мг/мл mAb3 не показал заметной деградации, когда в качестве стабилизатора были включены сахароза, трегалоза или аргинин. Результаты представлены в табл. 10. Глицерин также тестировали, но после лиофилизации наблюдалась значительная деградация.

Трегалозу объединяли с полиолами и аминокислотами для оценки способности стабилизировать лиофилизированное антитело. 2 мг/мл mAb3 объединяли с трегалозой (Tre) и любым из сорбитола (Sor), глицерина (Gly), аргинина (Arg) и аланина (Ala) в различных пропорциях. Изменение HMW видов оценивали при 25°C в различные сроки хранения. Результаты ( $\Delta\% \text{HMW}$ ) представлены в табл. 11. Не наблюдалось заметной деградации ни в одной из лиофилизированных комбинаций mAb3 2 мг/мл, протестированных после 3 месяцев хранения при 25°C.

Таблица 11

Влияние трегалозы и других наполнителей на  
стабильность mAb3 с низкой концентрацией ( $\Delta\%HMW$ )

	25°C/1 мес.	25°C/3 мес.	*25°C/120 мес.
10,0% трегалозы	0,01%		0,007%
9,09% Тре/0,48% Сор		0,03%	
6,66% Тре/1,77% Сор		0,01%	
5,00% Тре/2,66% Сор	0,01%		
5,00% Тре/1,34% Сор			0,007%
9,09% Тре/0,24% Гли	0,01%		
5,00% Тре/1,34% Гли		0,02%	
5,00% Тре/0,90% Гли			0,10%
9,09% Тре/0,28% Арг		0,01%	
8,33% Тре/0,51% Арг	0,04%	0,01%	
6,66% Тре/1,03% Арг	0,03%	0,04%	
5,00% Тре/1,54% Арг	0,05%	0,05%	0,33%
9,09% Тре/0,24% Ала	0,01%		
8,33% Тре/0,43% Ала	0,08%	0,08%	
6,66% Тре/0,87% Ала	0,06%	0,12%	
5,00% Тре/1,30% Ала	0,04%	0,2%	1,03%

\* Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорости от времени и кинетике Аррениуса.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток, содержащий:
  - (a) белок;
  - (b) стабилизатор, содержащий приблизительно 5% сахарозы от массы предварительно лиофилизированного остатка и аргинин в весовом отношении сахарозы к аргинину от приблизительно 3,2:1 до приблизительно 3,4:1;
  - (c) буфер и
  - (d) содержание влаги в количестве от приблизительно 3 до приблизительно 6 вес.% воды.
2. Лيوфилизированный остаток по п.1, причем указанный лиофилизированный остаток имеет температуру стеклования выше 25°C.
3. Лيوфилизированный остаток по п.1 или 2, содержащий приблизительно 3, приблизительно 3,5, приблизительно 4, приблизительно 4,5, приблизительно 5, приблизительно 5,5 или приблизительно 6 вес.% воды.
4. Лيوфилизированный остаток по любому из пп.1-3, содержащий приблизительно 4,5 вес.% воды.
5. Лيوфилизированный остаток по любому из пп.1-4, в котором указанный буфер содержит гистидин, причем необязательно указанный гистидин присутствует в количестве от приблизительно 0,34 до приблизительно 2,04 вес.%.
6. Лيوфилизированный остаток по любому из пп.1-5, дополнительно содержащий:
  - (a) стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из полиола, сахара, аминокислоты, соли и их комбинаций, причем необязательно: (i) указанный полиол выбран из группы, состоящей из сорбита, глицерина, маннита и их комбинации; (ii) указанный сахар представляет собой трегалозу; (iii) указанная аминокислота выбрана из группы, состоящей из аланина, пролина, глицина, хлорида натрия и их комбинации; и (iv) указанная соль представляет собой хлорид натрия; и/или
  - (b) стабилизатор присутствует в количестве от приблизительно 19 до приблизительно 83 вес.%.
7. Лيوфилизированный остаток по п.6, в котором указанный стабилизатор дополнительно содержит маннит, причем необязательно маннит присутствует в количестве от 8 до приблизительно 23 вес.%.
8. Лيوфилизированный остаток по п.6, в котором указанный стабилизатор дополнительно содержит сорбит, причем необязательно сорбит присутствует в количестве от приблизительно 1,3 до приблизительно 23 вес.% сорбитола.
9. Лيوфилизированный остаток по любому из пп.1-8, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество, причем необязательно:
  - (a) указанное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80, полиэтиленгликоля (ПЭГ), ПЭГ 3350 и их комбинации; или
  - (b) указанное поверхностно-активное вещество присутствует в количестве от приблизительно 0,02 до приблизительно 1 вес.%.

10. Лиофилизированный остаток по любому из пп.1-9, в котором указанный белок присутствует в количестве от приблизительно 6 до приблизительно 64 вес.%, от приблизительно 6 до приблизительно 19 вес.% или от приблизительно 33 до приблизительно 64 вес.%.

11. Лиофилизированный остаток по любому из пп.1-10, в котором указанный белок представляет собой антигенсвязывающий белок, причем необязательно указанный антигенсвязывающий белок выбран из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела и рецепторного-Fc-слитого белка.

12. Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток, содержащий:

(a) белок;

(b) стабилизатор в соотношении от приблизительно 0,2 ч. стабилизатора на 1 ч. белка по весу (0,2:1) до приблизительно 1,5 ч. стабилизатора на 1 ч. белка по весу (1,5:1), причем указанный стабилизатор содержит аргинин, сорбит, глицерин и/или аланин; и

(c) воду в концентрации от приблизительно 3 до приблизительно 6 вес.%.

13. Лиофилизированный остаток по п.12, в котором отношение стабилизатора к белку по весу выбрано из группы, состоящей из приблизительно 0,22:1, 0,44:1, 0,65:1, 0,87:1, 1,1:1, 1,3:1 по весу.

14. Лиофилизированный остаток по п.12 или 13, дополнительно содержащий:

(a) дополнительный стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из невосстанавливающего сахара, сахарного спирта, аминокислоты и их комбинации, причем необязательно указанный невосстанавливающий сахар включает сахарозу или трегалозу; указанный сахарный спирт выбран из группы, состоящей из сорбита, маннита и глицерина; и указанная аминокислота выбрана из группы, состоящей из аргинина, аланина, пролина и глицина; или

(b) невосстанавливающий сахар, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы или их комбинации.

15. Лиофилизированный остаток по п.14(b), дополнительно содержащий аргинин, маннит или сорбит, причем необязательно:

(a) отношение сахарозы к аргинину составляет от приблизительно 3,2:1 до приблизительно 3,4:1 по весу;

(b) отношение сахарозы к манниту составляет от приблизительно 1,8:1 до приблизительно 2:1 по весу;

(c) отношение трегалозы к аргинину составляет от приблизительно 3,2:1 до приблизительно 3,4:1 по весу или

(d) отношение трегалозы к сорбиту составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 2:1 по весу.

16. Лиофилизированный остаток по любому из пп.12-15, в котором деградированный белок содержит димер указанного белка, тример указанного белка, тетрамер указанного белка, мультимер высшего порядка указанного белка, химически модифицированный белок и их комбинацию.

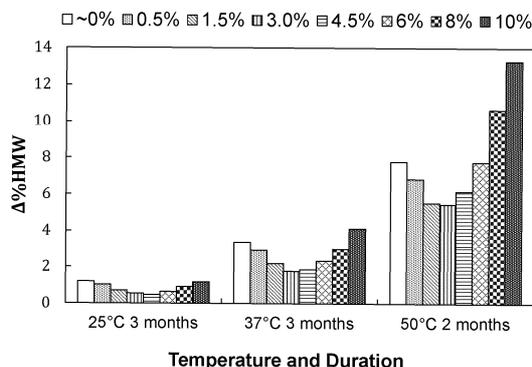
17. Лиофилизированный остаток по любому из пп.12-16, в котором указанный белок выбран из группы, состоящей из антитела, фрагмента антитела, рецепторного Fc-слитого белка.

18. Лиофилизированный остаток по любому из пп.12-17, дополнительно содержащий буфер, причем необязательно указанный буфер выбран из группы, состоящей из цитрата, фосфата, гистидина, сукцината, карбоната, ацетата и их комбинации.

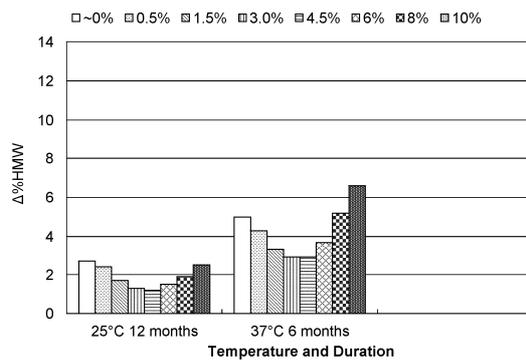
19. Способ получения фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка, включающий:

(a) стадию сушки, на которой удаляют воду из образца, содержащего белок, стабилизатор и воду, с получением фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка, содержащего от приблизительно 3 до приблизительно 6 вес.% влаги, причем указанный стабилизатор содержит аргинин, сорбит, глицерин и/или аланин; и

(b) нагревание указанного лиофилизированного остатка при температуре ниже температуры стеклования указанного фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.



Фиг. 1



Фиг. 2

