(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292612 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(22) Дата подачи заявки
2021.03.17

(51) Int. Cl. ***A61K 9/00*** (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 11/04 (2006.01)

(54) ЖИДКИЙ СОСТАВ GM-CSF ДЛЯ ИНГАЛЯЦИИ

(31) **62/990,810; 20164648.6**
(32) **2020.03.17; 2020.03.20**
(33) **US; EP**
(86) **PCT/EP2021/056851**
(87) **WO 2021/185921 2021.09.23**

(71) Заявитель:
ДРАГРЕКЬЮЭ АПС (DK)

(72) Изобретатель:
Скривер Ларс, Уоттс Алан (DK)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В., Христофоров А.А., Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) Изобретение относится к жидкому составу, содержащему рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rhGM-CSF), для ингаляции посредством распыления.

202292612 A1

202292612 A1

ЖИДКИЙ СОСТАВ GM-CSF ДЛЯ ИНГАЛЯЦИИ

Описание

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к жидкому составу, содержащему рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rhGM-CSF), для ингаляции.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, GM-CSF, первоначально идентифицировали как гемопоэтический фактор роста. Человеческий GM-CSF стимулирует рост миелоидных и эритроидных клеток-предшественников in vitro и активирует моноциты, макрофаги и гранулоциты при некоторых иммунных и воспалительных процессах (Gasson JC et al. *Prog Clin Biol Res*. 1990;352:375–384.; Gasson JC et al. *Prog Clin Biol Res.* 1990;338:27–41; Hart SP et al. *Biochem Soc Trans*. 1998;26(4):650–652; Rapoport AP et al. *Blood Rev*. 1992;6(1):43–57.). Он прроодуцируется рядом типов клеток, включая лимфоциты, моноциты, эндотелиальные клетки, фибробласты и некоторые злокачественные клетки (Metcalf D. *Blood*. 1986;67(2):257–267; ; Clark SC, Kamen R. *Science*. 1987;236(4806):1229–1237; Hart PH et al. *J Immunol*. 1988;141(5):1516–1521; Metcalf D et al. *Blood*. 1986;67(1):37–45). В дополнение к функции стимуляции роста и дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников GM-CSF, как было обнаружено, также обладает многообразием эффектов на клетки иммунной системы, экспрессирующие рецептор GM-CSF (см. для обзора: Hamilton JA. *Trends Immunol*. 2002;23(8):403–408; de Groot RP et al. *Cell Signal*. 1998;10(9):619–628).

Ингаляционная терапия на основе гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора была раскрыта для лечения пациентов, страдающих аутоиммунным легочным альвеолярным протеинозом (aPAP) (Tazawa R et al. *N Engl J Med*. 2019;381(10):923–932) нетуберкулезной микобактериальной (NTM) инфекцией (Scott JP et al. *Eur Respir J*. 2018;51(4):1702127), острым лучевым синдромом (Singh VK et al. *Cytokine*. 2015;71(1):22–37), острым респираторным дистресс-синдромом (Herold S et al. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(5):609–611) и кистозным фиброзом (Heslet L et al. *J Inflamm Res*. 2012;5:19–27), посредством распыления.

Ингаляционная терапия обладает наилучшим потенциалом для оптимальной доставки в легкие с уменьшением системных побочных эффектов. Ингаляционное лечение

нацелено на дыхательные пути, снижая дозу лекарственного средства, необходимую для оптимальной эффективности. Кроме того, при быстром начале действия лекарственного средства обычно наблюдается низкая частота возникновения системных побочных эффектов. Небулайзеры являются очень подходящим способом лечения поражений легких грибками или бактериями, поскольку они наполняют воздух очень мелким туманом вдыхаемых капель, способных осаждаться во всех областях легких.

Однако получение состава белка в виде жидкости для ингаляционной терапии представляет собой весьма сложный процесс, поскольку он требует, чтобы продукт был готов для добавления в небулайзер и оставался стабильным во время образования аэрозоля. Состав должен сохранять стабильность при длительном хранении, сводить к минимуму влияние распыления на целостность белка и иметь соответствующую тоничность для доставки в легкие. Таким образом, тонкий баланс между стабильностью, переносимостью в легких, включая потенциальную токсичность, и изотоничностью является ключевым для получения эффективного состава белка для ингаляционной терапии.

Такие проблемы не возникают, когда белки составляют в виде лиофилизированного продукта для ресуспендирования, поскольку изотоничность может быть достигнута при ресуспендировании, а долговременная стабильность обеспечивается только для высушенного лиофилата. Таким образом, один и тот же состав вспомогательных веществ не всегда применим для двух разных составов.

Жидкий состав GM-CSF (LEUKINE®) ранее был раскрыт для внутривенного введения (US2002141970A1). В US2002141970A1 предлагается добавление хелатирующего агента в качестве вспомогательного вещества для повышения стабильности соединения.

Состав раствора лекарственного средства для распыления предназначен для оптимизации растворимости и стабильности лекарственного средства, небольшие изменения в составе могут также повлиять на вдыхаемую массу, распределение частиц по размерам и время лечения.

Распыление сопряжено с неотъемлемым риском дестабилизации белков. Основной причиной нестабильности белка при распылении является разворачивание и агрегация на границе раздела фаз воздух-жидкость, таким образом, для использования GM-CSF для распыления требуется стабильный жидкий состав, готовый для применения для ингаляции и не приводящий к значительным изменениям при распылении.

Сущность настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к стабильному жидкому составу rhGM-CSF, который готов для применения для ингаляции и не проявляет значимую нестабильность при распылении.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения комбинация сахарного спирта или сахара, альбумина и полиэтиленгликоля (ПЭГ), и воды обеспечивает весьма стабильный жидкий состав rhGM-CSF.

Согласно одному варианту осуществления жидкий состав, описанный выше, предназначен для применения в качестве лекарственного средства для распыления.

Согласно одному варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF предназначен для применения для лечения aPAP или инфекции NTM.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки в легкие рекомбинантного rhGM-CSF, предусматривающему распыление rhGM-CSF, сахарного спирта, альбумина и ПЭГ.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к небулайзеру, содержащему жидкий состав rhGM-CSF, для применения для лечения aPAP или инфекции NTM.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Влияние маннита на % rhGM-CSF, остающийся через 3 месяца при 40°C

Влияние концентрации маннита на стабильность жидкого состава rhGM-CSF оценивали в ускоренных условиях в течение 3 месяцев. Обнаружили, что концентрация маннита влияет на стабильность лекарственного средства. Более высокие концентрации (50 мг/мл) маннита улучшали стабильность rhGM-CSF. По оси Y приведены оставшиеся % содержания rhGM-CSF по сравнению с T0.

Фиг. 2. Влияние уровня rhGM-CSF внутри групп концентрации маннита на % rhGM-CSF, остающийся через 3 месяца при 40°C

Влияние концентрации rhGM-CSF на стабильность жидкого состава также оценивали в ускоренных условиях в течение 3 месяцев. Было обнаружено, что концентрация rhGM-CSF влияет на стабильность лекарственного средства. Более высокие концентрации rhGM-CSF (400 мкг/мл) при определенных концентрациях маннита улучшали стабильность rhGM-CSF в жидком составе. По оси Y приведены оставшиеся % содержания rhGM-CSF по сравнению с T0.

Фиг. 3. Влияние rHA и ПЭГ 4000 на образование примесей rhGM-CSF

В течение 6 месяцев в условиях охлаждения и ускорения в составе, содержащем rHA и ПЭГ 4000 в качестве стабилизатора, образовывалось меньше примесей rhGM-CSF. Простой состав (незакрашенные кружки) не содержит rHA или ПЭГ 4000. Сложный состав (закрашенные кружки) содержит 1,0 мг/мл rHA и 0,1 мг/мл ПЭГ 4000.

Фиг. 4. Стабильность эффективности сложного состава rhGM-CSF в течение 18 месяцев

Стабильность эффективности сложного состава rhGM-CSF при распылении оценивали до 18 месяцев хранения при 5 и 25°C. Оценивали следующие три параметра: DD = доза, доставляемая при имитации дыхания (согласно USP <1601>, взрослые), FPF = фракция мелких частиц (капли менее 5 мкм) и MMAD = среднемассовый аэродинамический диаметр. Незначительные изменения или отсутствие изменений стабильности эффективности были обнаружены при распылении в моменты времени до 18 месяцев. На фиг. 4A и 4B представлены две отдельные партии.

Фиг. 5. Стабильность в течение 3 месяцев состава с низкой концентрацией rHA

Вариант сложного состава rhGM-CSF с низкой концентрацией rHA (0,2 мг/мл) оценивали и продемонстрировали улучшенную стабильность по сравнению с простым составом, который не включал rHA или ПЭГ 4000.

<u>Подробное описание настоящего изобретения</u>

Настоящее изобретение относится к жидкому составу рекомбинантного человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rhGM-CSF) для применения при введении путем ингаляции, где жидкий состав содержит rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин и воду.

Комбинация этих специфических вспомогательных веществ обеспечивает высокую стабильность rhGM-CSF в жидком составе, который готов для применения для ингаляционной терапии.

Согласно одному варианту осуществления указанным rhGM-CSF является молграмостим (SEQ ID NO: 1), сарграмостим (SEQ ID NO: 2) или реграмостим.

Аминокислотная последовательность молграмостима идентична аминокислотной последовательности эндогенного человеческого GM-CSF. Аминокислотная последовательность сарграмостима отличается от природного GM-CSF заменой лейцина в положении 23. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанным rhGM-

CSF является молграмостим (SEQ ID NO: 1). Молграмостим представляет собой негликозилированный rhGM-CSF, экспрессируемый в E coli.

Согласно одному варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF включает сахар, где указанный сахар выбран из группы, состоящей из мальтозы, трегалозы, сахарозы, маннозы, лактозы или галактозы.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF включает сахарный спирт, выбранный из группы, содержащей маннит или сорбит. Добавление полиольного сахара в жидкий состав rhGM-CSF повышает стабильность. Кроме того, его применяют в качестве агента, регулирующего тоничность, для обеспечения изотоничности состава с плазмой человека. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанным сахарным спиртом является маннит.

Альбумин представляет собой семейство глобулярных белков, наиболее распространенными из которых являются сывороточные альбумины. Человеческий сывороточный альбумин (HSA) является наиболее распространенным белком, обнаруживаемым в плазме крови человека. Добавление HSA способствует стабильности жидкого состава rhGM-CSF. Кроме того, изобилие и естественная самопереносимость альбумина сводит к минимуму вероятность того, что HSA вызовет иммунный ответ у данной популяции пациентов.

Таким образом, согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF включает альбумин. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанным альбумином является HSA. Согласно другому предпочтительному варианту осуществления указанным альбумином является рекомбинантный человеческий альбумин (rHA).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF дополнительно содержит ПЭГ. Такие ПЭГ включают без ограничения ПЭГ 1000, ПЭГ 1550, ПЭГ 2000, ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 или ПЭГ 8000. Таким образом, согласно одному варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF дополнительно содержит выбранный из группы, содержащей ПЭГ 1000, ПЭГ 1550, ПЭГ 2000, ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 или ПЭГ 8000. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанным ПЭГ является ПЭГ-4000.

Концентрация белка имеет решающее значение для обеспечения стабильного и готового для применения состава. Повышение концентрации rhGM-CSF может повысить стабильность жидкого состава rhGM-CSF. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения концентрация rhGM-CSF составляет по меньшей мере 150 мкг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения концентрация rhGM-

CSF в раскрытом жидком составе находится в интервале 150-500 мкг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения концентрация rhGM-CSF в раскрытом жидком составе находится в интервале 200-300 мкг/мл. Настоящее раскрытие показывает, что увеличение концентрации rhGM-CSF в присутствии сахарного спирта маннита стабилизирует жидкий состав (фиг. 2).

Для обеспечения баланса между изотоничностью и стабильностью жидкого состава rhGM-CSF для ингаляции вариант осуществления настоящего изобретения раскрывает жидкий состав rhGM-CSF, в котором концентрация сахарного спирта или сахара составляет по меньшей мере 25 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения концентрация сахарного спирта находится в интервале 45-100 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения концентрация сахарного спирта находится в интервале 45-55 мг/мл. Как видно на фиг. 1 настоящего раскрытия, повышение концентрации сахарного спирта маннита улучшает стабильность rhGM-CSF. Стабилизирующий эффект маннита наблюдается при концентрации сахарного спирта 25 мг/мл. Этот эффект значительно усиливается при концентрации 50 мг/мл.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF содержит альбумин при концентрации по меньшей мере 0,2 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF содержит альбумин в диапазоне концентрации 0,2-10 мг/мл, как например, 0,3-5 мг/мл, как например, 0,5-1,5 мг/мл. На фиг. 3 настоящего изобретения показано, что меньшее количество примесей rhGM-CSF образуется в жидком составе rhGM-CSF, содержащем rHA и ПЭГ 4000 в качестве стабилизатора (сложный состав), как в условиях охлаждения, так и в ускоренных условиях. Кроме того, на фиг. 5 видно, что стабилизирующий эффект альбумина можно наблюдать уже при концентрациях 0,2 мг/мл, при этом стабилизирующий эффект усиливается при увеличении концентраций.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF содержит ПЭГ, например, при концентрации максимум 50, как например, максимум 40, как например, максимум 30, как например, максимум 20, как например, максимум 10, как например, максимум 1 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения концентрация ПЭГ находится в диапазоне концентрации 0,05-0,5 мг/мл, как например, 0,05-0,3 мг/мл, как например, 0,05-0,2 мг/мл. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF содержит ПЭГ в диапазоне концентрации 0,05-0,15 мг/мл.

Выбор оптимальной комбинации и концентрации вспомогательных веществ и биотерапевтических средств является весьма специфическим и сложным процессом,

уникальным для каждого индивидуального состава белка. Настоящее изобретение раскрывает один вариант осуществления жидкого состава rhGM-CSF, где rhGM-CSF представляет собой молграмостим (SEQ ID NO: 1), указанный сахарный спирт представляет собой маннит, указанный альбумин представляет собой рекомбинантный человеческий альбумин, а указанный ПЭГ представляет собой ПЭГ-4000.

Согласно одному варианту осуществления концентрация rhGM-CSF составляет по меньшей мере 150 мкг/мл, концентрация маннита составляет по меньшей мере 25мг/мл, концентрация рекомбинантного человеческого альбумина составляет по меньшей мере 0,2 мг/мл, и концентрация ПЭГ-4000 составляет максимум 1 мг/мл.

Согласно другому варианту осуществления концентрация rhGM-CSF составляет 150-500 мкг/мл, концентрация маннита составляет 45-100 мг/мл, концентрация рекомбинантного человеческого альбумина составляет 0,5-1,5 мг/мл, и концентрация ПЭГ-4000 составляет 0,05-0,15 мг/мл.

Согласно предпочтительному варианту осуществления концентрация rhGM-CSF находится в интервале 200-300мкг/мл, концентрация маннита составляет 50 мг/мл, концентрация рекомбинантного человеческого альбумина составляет 1 мг/мл и концентрация ПЭГ-4000 составляет 0,1 мг/мл.

Буферы добавляют в состав для регулирования и стабилизации значения pH и оптимизации растворимости и стабильности лекарственного средства. Для лекарственных средств для ингаляции желательно, чтобы значение pH продукта было близко к физиологическому значению pH. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF дополнительно содержит буфер. Согласно предпочтительному варианту осуществления указанный буфер содержит моногидрат лимонной кислоты и Na_2HPO_4.

Осмоляльность состава является ключевым параметром для пригодности жидкого состава для ингаляции. Предпочтительно, жидкий состав является по существу изотоническим. Таким образом, согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения осмоляльность состава составляет от 250 до 375 мОсм/л, предпочтительно от 325 до 335 мОсм/л.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к жидкому составу rhGM-CSF, в котором % rhGM-CSF, оставшиеся после 3 месяцев хранения при 40°C, составляют более 60%. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к жидкому составу rhGM-CSF, в котором уровень образования примесей после 6 месяцев при 25°C составляет менее 5%.

Кроме того, согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки в легкие rhGM-CSF, предусматривающему распыление rhGM-CSF, сахарного спирта, альбумина и ПЭГ.

Раскрытый в настоящем документе жидкий состав rhGM-CSF особенно хорошо подходит для распыления. Данные, приведенные в настоящем документе, демонстрируют, что эффективность молграмостима для жидкого состава, содержащего rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин, ПЭГ и воду, сохраняет 99,4% биологической эффективности rhGM-CSF при распылении. Кроме того, было обнаружено, что после распыления этого жидкого состава rhGM-CSF, rhGM-CSF остается в значительной степени интактным после процесса распыления. Наконец, при распылении жидкого состава, раскрытого в настоящем документе, в моменты времени до 18 месяцев обнаружено незначительное изменение или отсутствие изменений стабильности эффективности.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 90%, как например, по меньшей мере 95%, как например, по меньшей мере 98%, как например, по меньшей мере 99% биологической эффективности rhGM-CSF сохраняется после распыления.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения состав является стабильным при хранении в течение по меньшей мере 18 месяцев при 25°C.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав предназначен для применения для введения в легкие. Для облегчения введения в легкие состав должен быть распылен в виде мелких капель, пригодных для вдыхания, где крупная фракция имеет диаметр менее 5 мкм. Для биологического препарата состав должен сохранять стабильность во время процесса образования аэрозоля, когда высокие уровни механической энергии и увеличенная площадь поверхности раздела фаз воздух-жидкость могут привести к денатурации и/или агрегации белка. Составы также должны включать вспомогательные вещества, безопасные для введения в легкие, и с подходящим диапазоном значений pH и тоничности.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения жидкий состав rhGM-CSF предназначен для применения для лечения инфекции легких.

Согласно другому варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF предназначен для применения для лечения бактериальной, вирусной или грибковой инфекции в легких. Согласно одному варианту осуществления бактериальная инфекция выбрана из группы, состоящей из: *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus, Staphylococcus aureus* и *Mycobacterium tuberculosis*. Согласно другому варианту осуществления вирусная инфекция выбрана из группы, состоящей из бронхита, пневмонии и бронхиолита. Согласно другому

варианту осуществления грибковая инфекция выбрана из группы, состоящей из *Aspergillus, Cryptococcus, Pneumocystis* и эндемических грибов.

Согласно предпочтительному варианту осуществления жидкий состав rhGM-CSF предназначен для применения для лечения аутоиммунного легочного альвеолярного протеиноза (aPAP) или нетуберкулезной микобактериальной (NTM) инфекции, туберкулеза, ARDS, гриппозной инфекции, коронавирусной инфекции, острого и хронического лучевого синдрома, бронхиальной астмы, COPD, легочного фиброза, рака легких и респираторного воспалительного заболевания. Состав также можно применять профилактически для стимуляции иммунологического ответа и защиты от легочной инфекции.

Согласно варианту осуществления настоящего изобретения раскрыт жидкий состав rhGM-CSF для применения в качестве лекарственного средства для распыления. Согласно другому варианту осуществления раскрыт жидкий состав rhGM-CSF для применения для лечения aPAP или инфекции NTM.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения медицинского состояния, предусматривающему введение жидкого состава rhGM-CSF посредством распыления индивидууму, нуждающемуся в этом. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения aPAP или инфекции NTM, предусматривающему введение жидкого состава rhGM-CSF индивидууму, нуждающемуся в этом.

APAP является редким аутоиммунным заболеванием легких. Это наиболее распространенная форма (90% случаев) легочного альвеолярного протеиноза (PAP). В большинстве случаев страдают взрослые в возрасте от 20 до 50 лет. У некоторых людей симптомы могут не проявляться, в то время как у других может прогрессировать затрудненное дыхание и одышка при физической нагрузке. Другие признаки и симптомы могут включать сухой хронический кашель, усталость, потерю веса, боль в груди и общее ощущение нездоровья. В редких случаях может наблюдаться кровохарканье, округление и отек кончиков пальцев и цианоз. Аутоиммунный PAP вызывается нарушением работы иммунной системы из-за антител IgG, которые блокируют действие GM-CSF. GM-CSF регулирует клиренс поверхностно-активного вещества (смеси белка и жира) альвеолярными макрофагами. Поверхностно-активное вещество накапливается в воздушных мешочках легких (альвеолах) и в конечном итоге приводит к неспособности дышать. Стандартным лечением является процедура, называемая промыванием легких.

NTM представляют собой микобактерии, которые не вызывают туберкулез или проказу (известную также как болезнь Хансена). NTM действительно вызывают легочные

заболевания, напоминающие туберкулез. Наиболее частым клиническим проявлением болезни NTM является заболевание легких, но также важны лимфатическое, кожное/мягких тканей и диссеминированное заболевание. Легочное заболевание, вызванное NTM, чаще всего наблюдается у женщин в период постменопаузы и у пациентов с сопутствующим заболеванием легких, таким как кистозный фиброз, бронхоэктаз и предшествующий туберкулез. Нередко у пациентов с дефицитом альфа-1-антитрипсина, синдромом Марфана и первичной цилиарной дискинезией наблюдается легочная колонизация NTM и/или инфекция. Легочный NTM также может быть обнаружен у людей со СПИДом и злокачественным заболеванием.

Клинические симптомы различаются по масштабу и интенсивности, но обычно включают хронический кашель, часто с гнойной мокротой. Может также присутствовать кровохарканье. Системные симптомы включают недомогание, утомляемость и потерю веса на поздних стадиях заболевания. Диагноз легочной инфекции, вызванной M. abscessus, требует наличия симптомов, рентгенологических аномалий и микробиологических культур.

Настоящее изобретение относится к ингалятору, содержащему жидкий состав rhGM-CSF согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительному варианту осуществления ингалятор представляет собой небулайзер. Типы небулайзеров включают струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры и небулайзеры с вибрирующей сеткой. Другие варианты осуществления включают жидкостные ингаляторы, распыление поверхностными акустическими волнами и капиллярные аэрозольные генераторы.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу доставки rhGM-CSF в легкие, предусматривающему распыление жидкого состава rhGM-CSF, где жидкий состав содержит rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин и воду, посредством чего указанный rhGM-CSF доставляется в легкие.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к небулайзеру, содержащему жидкий состав rhGM-CSF, для применения для лечения aPAP или инфекции NTM. Включены струйные небулайзеры, ультразвуковые небулайзеры и небулайзеры с вибрирующей сеткой.

Примеры

Влияние различных составов на стабильность rhGM-CSF изучали с помощью ВЭЖХ.

Содержание и чистоту каждого состава оценивали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Определение структур более высокого

порядка (агрегатов) и продуктов разложения rhGM-CSF оценивали с помощью эксклюзионной высокоэффективной хроматографии (SE-ВЭЖХ).

Пример 1 (фиг. 1). Влияние концентрации маннита

Три параметра состава молграмостима варьировали в соответствии с приведенной ниже таблицей (таблица 1).

1. Уровень маннита (от 0 до 50 мг/мл): одновременно регулировали концентрацию буфера таким образом, чтобы состав оставался изотоническим.

2. Стабилизатор (1 из 4 вариантов): rHA и ПЭГ, только rHA, без стабилизатора и только Tween 80

3. Уровень молграмостима (от 0,1 до 0,4 мг/мл)

Таблица 1

		Стабилизатор					
№ состава	Концентрация маннита (мг/мл)	Рекомбинантный человеческий альбумин (rHA) (мг/мл)	ПЭГ 4000 (мг/мл)	Tween 80 (мг/мл)	Концентрация молграмостима (мг/мл)	Двухосновный фосфат натрия (мг/мл)	Моногидрат лимонной кислоты (мг/мл)
1	50	0	0	0,1	0,4	2,580	0,283
2	25	0	0	0,1	0,1	7,740	0,850
3	25	0	0	0	0,2695	7,740	0,850
4	25	1	0	0	0,4	7,740	0,850
5	0	1	0,1	0	0,25	15,480	1,699
6	0	0	0	0,1	0,4	15,480	1,699
7	25	1	0	0	0,25	7,740	0,850
8	50	1	0	0	0,2095	2,580	0,283
9	50	1	0,1	0	0,4	2,580	0,283
10	25	0	0	0	0,25	7,740	0,850
11	0	1	0	0	0,1	15,480	1,699
12	50	0	0	0	0,1	2,580	0,283
13	0	0	0	0,1	0,208	15,480	1,699
14	0	1	0,1	0	0,4	15,480	1,699
15	33,25	1	0,1	0	0,1	6,450	0,708

Данные получали способом ОФ-ВЭЖХ. Флаконы хранили в течение 3 месяцев при 40°С. Получали два препарата для каждого из 15 составов в таблице выше.

Первичный результат данного исследования представлен на фиг. 1. Уровень маннита оказал заметное влияние на стабильность в ускоренных условиях через 3 месяца.

Пример 2 (фиг. 2). Влияние концентрации rhGM-CSF

Из данных, собранных, как описано в примере 1, далее наблюдали, что увеличение концентрации rhGM-CSF также оказывало заметное влияние на стабильность состава rhGM-CSF при определенных концентрациях маннита.

Пример 3. Влияние rHA и ПЭГ-4000 (фиг. 3)

Влияние rHA и ПЭГ-4000 на стабильность состава молграмостима для распыления изучали при следующих условиях.

Таблица 3. Стабильность образца простого состава

Условия хранения	Образцы на момент времени стабильности						Резерв	Общее количество, необходимое на условие
	Начальный Т=0	0,5 месяца	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	необязательно		
4^0С/ RH окружающей среды	9 флаконов		12 флаконов	12 флаконов	18 флаконов	18 флаконов	12 флаконов	81 флакон
25^0С/ 60% RH			12 флаконов	12 флаконов	18 флаконов	18 флаконов	12 флаконов	72 флакона
40^0С/ 75% RH		12 флаконов	12 флаконов	12 флаконов		18 флаконов	12 флаконов	66 флаконов
В общем	129 флаконов					54 флакона	36 флаконов	219 флаконов

Получение состава

Исследования стабильности проводили с использованием вариантов (сложного и простого) состава молграмостима, как описано ниже.

Сложный состав молграмостима

Сложный состав получали из расчета на массу в соответствии с приведенным ниже описанием. Стерильную фильтрацию проводили только для составленного продукта. Состав готового составленного продукта соответствует таблице ниже.

Ингредиент	**Количество на флакон (1,2 мл)**
Молграмостим	0,300 мг
Маннит	60 мг
Моногидрат лимонной кислоты	0,34 мг
Гидрофосфат динатрия, безводный	3,1 мг
Recombumin Prime (rHSA)	1,2 мг
ПЭГ 4000	0,120 мг
Вода для инъекций	до 1,2 мл

Для получения сложного состава rhGM-CSF сначала готовили буфер в соответствии со следующей процедурой:

Получение буфера цитрата/фосфата/HSA (Размер иллюстративной партии = 2000 г)

Ингредиент	**Количество на партию 2000 г**
Маннит	94,87±0,9 г
ПЭГ 4000	0,190 ±0,002 г
Моногидрат лимонной кислоты	0,531 ± 0,05 г
Гидрофосфат динатрия, безводный	4,934 ± 0,49 г
Recombumin Prime (rHSA)	9,488 ± 0,09 г
ПЭГ 4000	до 2000,0 ± 1,0 г

rHSA извлекали после хранения при 2-8°C и давали возможность уравновеситься до комнатной температуры. Требуемые количества маннита, ПЭГ 4000, моногидрата лимонной кислоты, гидрофосфата динатрия (безводного) и rHSA предварительно взвешивали в соответствующих контейнерах. Чистый химический стакан/бутылку и мешалку помещали на весы с верхней загрузкой, и вес стакана и мешалки регистрировали

и тарировали. В химический стакан добавляли приблизительно 800 г воды для инъекций (WFI). Требуемые количества моногидрата лимонной кислоты, гидрофосфата динатрия (безводного), маннита и ПЭГ 4000 добавляли к WFI, химический стакан переносили на мешалку и смесь перемешивали до растворения всех твердых веществ. Химический стакан снова помещали на весы с верхней загрузкой и добавляли в стакан необходимое количество rHSA. Затем химический стакан переносили на мешалку и раствор осторожно перемешивали в течение приблизительно 5 минут или до тех пор, пока раствор не станет гомогенным. Следует избегать пенообразования. Наконец, добавляли WFI до целевого количества 2000 г, и раствор снова осторожно перемешивали в течение приблизительно 10 минут, избегая пенообразования. Буфер метили и хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки. Этот буфер можно хранить при температуре 2-8 °C до 100 часов.

Получение составленного продукта rhGM-CSF (Размер иллюстративной партии = 1000 г)

После получения буфера сложный состав rhGM-CSF получали согласно следующей процедуре:

Масса (г) раствора rhGM-CSF = A

Масса (г) составленного продукта = A + (10,1507 · A)

Ингредиент	**Количество на партию 1000 г**
rhGM-CSF (2,74 мг/мл)	100 г
Цитратно-фосфатный буфер с HAS	до 1115,71 ± 1,11 г

rhGM-CSF оттаивали в течение 24 часов ± 4 часа при 2-8°C. Если сыпучий материал не оттаял в течение этого времени, оттаивание продолжали при комнатной температуре путем осторожного поворота бутылки. Бутылку не следует встряхивать и следует избегать пенообразования. Требуемое количество rhGM-CSF предварительно взвешивали в контейнере подходящего размера. Чистую бутылку и мешалку помещали на весы с верхней загрузкой. Вес химического стакана и мешалки регистрировали и тарировали. Приблизительно 800 г буфера цитрат/фосфат/rHA добавляли в химический стакан, а затем в химический стакан также добавляли предварительно взвешенное количество rhGM-CSF. Контейнер с rhGM-CSF промывали буфером цитрат/фосфат/HSA и промывную жидкость переносили в химический стакан. Затем химический стакан помещали на мешалку и смесь осторожно перемешивали в течение приблизительно 5 минут, избегая пенообразования. Смесь проверяли на полную однородность. Добавляли буфер цитрат/фосфат/HSA до

достижения конечной массы 1000 г с последующим осторожным перемешиванием в течение приблизительно 10 минут, избегая пенообразования. Составленный продукт фильтровали, используя фильтрующие узлы Millipore Stericup (мембрана PVDF (Durapore), очень низкое связывание с белком, размер пор 0,22 мкм), и составленный продукт хранили при 2-8°C в защищенном от света месте.

Простой состав молграмостима

Простой состав rhGM-CSF получали из расчета на объем, поскольку плотность буфера простого состава неизвестна. Концентрации и количества ингредиентов в готовом составленном продукте на флакон показаны в таблице ниже.

Ингредиент	**Концентрация (мг/мл)**	**Количество на флакон (1,2 мл)**
Молграмостим	0,250	0,300 мг
Маннит	50,0	60 мг
Моногидрат лимонной кислоты	0,283	0,34 мг
Гидрофосфат динатрия, безводный	2,58	3,1 мг
Вода для инъекций	до 1 мл	до 1,2 мл

Получение составленного продукта rhGM-CSF (Размер иллюстративной партии = 1000 мл)

Ингредиент	**Количество на партию 1000 г**
rhGM-CSF (2,74 мг/мл, плотность = 1 г/мл))	91,24 ± 0,10 г
Маннит	50,0 ± 0,5 г
Моногидрат лимонной кислоты	0,283 ± 0,003 г
Гидрофосфат динатрия, безводный	2,58 ± 0,03 г
Вода для инъекций	до 1000,0 г ± 1,0 г

Требуемые количества маннита, моногидрата лимонной кислоты, гидрофосфата динатрия (безводного) предварительно взвешивали в соответствующих контейнерах. Приблизительно 800 мл воды для инъекций (WFI) добавляли в химический стакан с мешалкой. К WFI добавляли моногидрат лимонной кислоты, гидрофосфат динатрия (безводный) и маннит. Смесь перемешивали до растворения всех твердых веществ. В химический стакан добавляли необходимое количество rhGM-CSF, контейнер с rhGM-CSF

промывали WFI и промывную жидкость переносили в химический стакан. Химический стакан помещали на мешалку и смесь осторожно перемешивали в течение приблизительно 5 минут, избегая пенообразования. Проверяли на полную гомогенность.

Содержимое химического стакана переносили в мерную колбу объемом 1 л. Химический стакан промывали WFI и промывную жидкость переносили в мерную колбу. Следует соблюдать осторожность, чтобы во время переноса избежать пенообразования. В мерную колбу добавляли WFI до QS до 1 л и содержимое перемешивали путем осторожного переворачивания колбы. Составленный продукт фильтровали, используя фильтрующие узлы Millipore Stericup (мембрана PVDF (Durapore), очень низкое связывание белка, размер пор 0,22 мкм). Готовый составленный продукт хранили при 2-8°C в защищенном от света месте.

Основной результат этого исследования представлен на фиг. 2. Меньше примесей rhGM-CSF образовывалось в составе, содержащем rHA и ПЭГ 4000 в качестве стабилизатора (состав состав), как в условиях охлаждения, так и в ускоренных условиях. Кроме того, в приведенных ниже таблицах показано, что сложный состав имеет явно более высокую чистоту при хранении в течение 12 дней при 40 °C по сравнению с простым составом:

Простой состав, 40°C

упаковочный материал	**чистота, среднее значение**	**содержание [мг/мл], среднее значение**
6R стеклянный флакон	88,0%	0,30
PP шприц	92,0%	0,30
стеклянный шприц	91,3%	0,30

Сложный состав, 40°C

упаковочный материал	**чистота, среднее значение**	**содержание [мг/мл], среднее значение**
6R стеклянный флакон	94,7%	0,31
PP шприц	94,9%	0,30
стеклянный шприц	94,9%	0,30

Пример 4. Стабильность при распылении

Стабильность сложного состава rhGM-CSF после распыления оценивали путем сравнения нераспыленного состава с конденсированным распыленным составом и сравнения обнаруженных примесей и агрегатов белка.

Аэрозоль, генерируемый вибрирующей сеткой, собирали непосредственно после распыления, собирая в полипропиленовую пробирку, расположенную напротив сетки.

Примеси и агрегаты белка обнаруживали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC), соответственно. Состав, оцененный в этом исследовании, был идентичен сложному составу rhGM-CSF, описанному выше, за исключением того, что концентрация rhGM-CSF составляла 300 мкг/мл, а не 250 мкг/мл. Высокая концентрация молграмостима может с большей вероятностью демонстрировать нестабильность, что представляет собой наихудший сценарий.

Обнаружение неизвестных примесей, определяемое посредством ВЭЖХ, приведено в таблице 2 ниже. Относительное время удерживания (RRT) этих пиков по отношению к основному пику составляло 0,87, 0,96 и 1,07. После распыления с использованием устройства Head type 30 обнаружили небольшое повышение RRT 0,87 в распыленном образце (0,26%) и остатке в резервуаре (0,32%). Эти результаты демонстрируют, что rhGM-CSF остается в значительной степени интактным после процесса распыления.

Таблица 2. Сравнение родственных примесей с помощью ОФ-ВЭЖХ

	#	RTT 0,87 (% площади)	RTT 0,96 (%площади)	RTT 1,07 (%площади)
Необработанный образец	1	0,22	0,48	0,49
	2	нет пика	0,64	0,40
Распыленный образец	1	0,26	0,45	0,40
	2	0,26	0,45	0,27
	3	0,27	0,40	0,36
Образец, оставшийся в резервуаре	1	0,30	0,28	0,36
	2	0,36	0,56	0,44
	3	0,31	0,50	0,60

Первоначальное исследование образования примесей и агрегатов в результате распыления проводили путем улавливания и анализа аэрозоля, образующегося с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой (PARI eFlow). При оценке агрегации с помощью SEC

отметили заметную разницу в агрегатах, связанных с альбумином, обозначенных как HMW 1 и HMW 2. Эти данные позволили сделать вывод, что некоторая агрегация альбумина вызвана процессом распыления, однако, большая часть белка в составе остается неагрегированной.

Таблица 3. Сравнение высокомолекулярных примесей (HMW) с помощью SE-UPLC

	HMW 1 (% общей площади)	HMW 2 (%общей площади)	rHA (%общей площади)	rhGM-CSF (%общей площади)	LMW (%общей площади)	Unk (%общей площади)
Необработанный образец	--	1,89	69,53	26,55	2,03	--
Распыленный образец	0,69	8,73	62,62	25,71	2,02	--
Образец, оставшийся в резервуаре	--	2,01	68,65	25,80	2,10	0,48

Таблица 4. Содержание молграмостима до и после распыления

Тип головки распылителя	**Образец**	**Среднее содержание молграмостима (мкг/мл) ± стандартное отклонение (n=3)**	**Содержание, оставшееся после распыления (%)**
Тип головки 30	нераспыленный	297,9 ± 5,1	--
	распыленный	282,5 ± 2,7	94,8
Тип головки 40	нераспыленный	290,8 ± 0,4	--
	распыленный	277,9 ± 0,6	95,6

Данные, собранные в Таблице 4, представляют собой концентрацию rhGM-CSF в сложном составе до и после распыления с помощью небулайзера с вибрирующей сеткой. Содержание измеряли с помощью ОФ-ВЭЖХ

Наконец, эффективность молграмостима также оценивали до и после распыления, и обнаружили, что после распыления 99,4% биологической эффективности GM-CSF

сохранялось для сложного состава. Биологическую эффективность определяли с помощью анализа клеточной линии TF-1.

Пример 5. Стабильность эффективности сложного состава rhGM-CSF

Стабильность эффективности сложного состава rhGM-CSF при распылении оценивали до 18 месяцев хранения при 5 и 25°C. Оценивали следующие три параметра: DD = доза, доставляемая при имитации дыхания (согласно USP <1601>, взрослые), FPF = фракция мелких частиц (капли менее 5 мкм) и MMAD = среднемассовый аэродинамический диаметр. Незначительные изменения или отсутствие изменений стабильности эффективности обнаруживали при распылении в моменты времени до 18 месяцев. Данные по эффективности получали с помощью фармацевтического каскадного воздействия в соответствии с USP <601>.

Пример 6. Стабильность состава с низкой концентрацией rHA

Вариант сложного состава rhGM-CSF с низкой концентрацией rHA (0,2 мг/мл) оценивали и продемонстрировали улучшенную стабильность по сравнению с простым составом, который не включал rHA или ПЭГ 4000. Содержание rhGM-CSF измеряли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий состав рекомбинантного человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rhGM-CSF) для применения при введении путем ингаляции, где жидкий состав содержит rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин и воду.

2. Жидкий состав для применения по п. 1, где указанным rhGM-CSF является молграмостим (SEQ ID NO: 1), сарграмостим (SEQ ID NO: 2) или реграмостим.

3. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанный сахар представляет собой мальтозу, трегалозу, сахарозу, маннозу, лактозу или галактозу, или где указанный сахарный спирт представляет собой маннит или сорбит.

4. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанным альбумином является рекомбинантный человеческий альбумин.

5. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где состав дополнительно содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), где указанный ПЭГ выбран из группы, состоящей из ПЭГ 1000, ПЭГ 1550, ПЭГ 2000, ПЭГ 3000, ПЭГ 3350, ПЭГ 4000 или ПЭГ 8000, предпочтительно ПЭГ-4000.

6. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация rhGM-CSF составляет по меньшей мере 150 мкг/мл.

7. Жидкий состав для применения по п. 6, где концентрация rhGM-CSF находится в интервале 150-500 мкг/мл, предпочтительно 200-300 мкг/мл

8. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация сахарного спирта составляет по меньшей мере 25 мг/мл.

9. Жидкий состав для применения по п. 8, где концентрация сахарного спирта находится в интервале 45-100 мг/мл, предпочтительно 45-55 мг/мл.

10. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация альбумина составляет по меньшей мере 0,2 мг/мл.

11. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация альбумина находится в интервале 0,5-1,5 мг/мл.

12. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация ПЭГ составляет максимум 50, как например, максимум 40, как например, максимум 30, как например, максимум 20, как например, максимум 10, как например, максимум 1 мг/мл.

13. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где концентрация ПЭГ находится в интервале 0,05-0,15 мг/мл.

14. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где указанным rhGM-CSF является молграмостим (SEQ ID NO: 1), указанным сахарным спиртом является маннит, указанным альбумином является рекомбинантный человеческий альбумин, и указанным ПЭГ является ПЭГ-4000.

15. Жидкий состав для применения по п. 1, где

концентрация rhGM-CSF составляет по меньшей мере 150 мкг/мл,

концентрация маннита составляет по меньшей мере 25 мг/мл,

концентрация рекомбинантного человеческого альбумина составляет по меньшей мере 0,2 мг/мл, и концентрация ПЭГ-4000 составляет максимум 1 мг/мл.

16. Жидкий состав для применения по п. 15, где

концентрация rhGM-CSF составляет 200-300 мкг/мл,

концентрация маннита составляет 45-100 мг/мл,

концентрация рекомбинантного человеческого альбумина составляет 0,5-1,50 мг/мл, и

концентрация ПЭГ-4000 составляет 0,05-0,15 мг/мл.

17. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий буфер, такой как моногидрат лимонной кислоты или Na_2HPO_4.

18. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где осмоляльность состава составляет от 250 до 375 мОсм/л, предпочтительно от 325 до 335 мОсм/л.

19. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где % rhGM-CSF, оставшийся после 3 месяцев хранения при 40°C, составляет более 60%, и/или где уровень образования примесей через 6 месяцев при 25°C составляет менее 5%.

20. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где по меньшей мере 90% как например, по меньшей мере 95% как например, по меньшей мере 98% как например, по меньшей мере 99% биологической эффективности rhGM-CSF сохраняется после распыления.

21. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где состав является стабильным при хранении в течение по меньшей мере 18 месяцев при 25°C.

22. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкий состав для ингаляции является распыляемым.

23. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где жидкий состав предназначен для применения для введения в легкие.

24. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где применение предназначено для лечения инфекции легких.

25. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где применение предназначено для лечения бактериальной, вирусной или грибковой инфекции в легких.

26. Жидкий состав для применения по любому из предшествующих пунктов, где применение предназначено для лечения аутоиммунного легочного альвеолярного протеиноза (aPAP) или нетуберкулезной микобактериальной (NTM) инфекции.

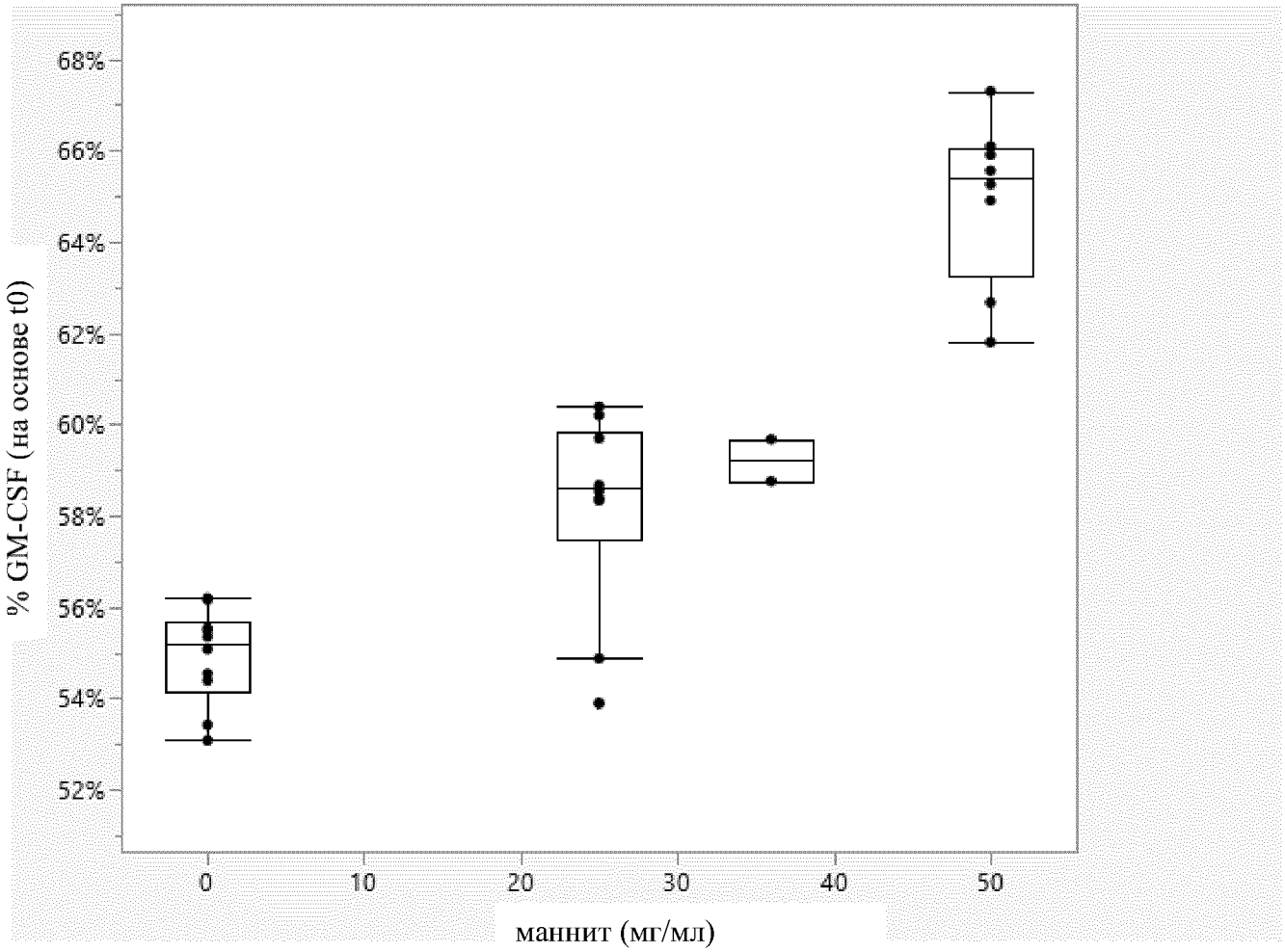
27. Ингалятор, содержащий жидкий состав по любому из предшествующих пунктов.

28. Ингалятор по п. 27, где ингалятором является небулайзер.

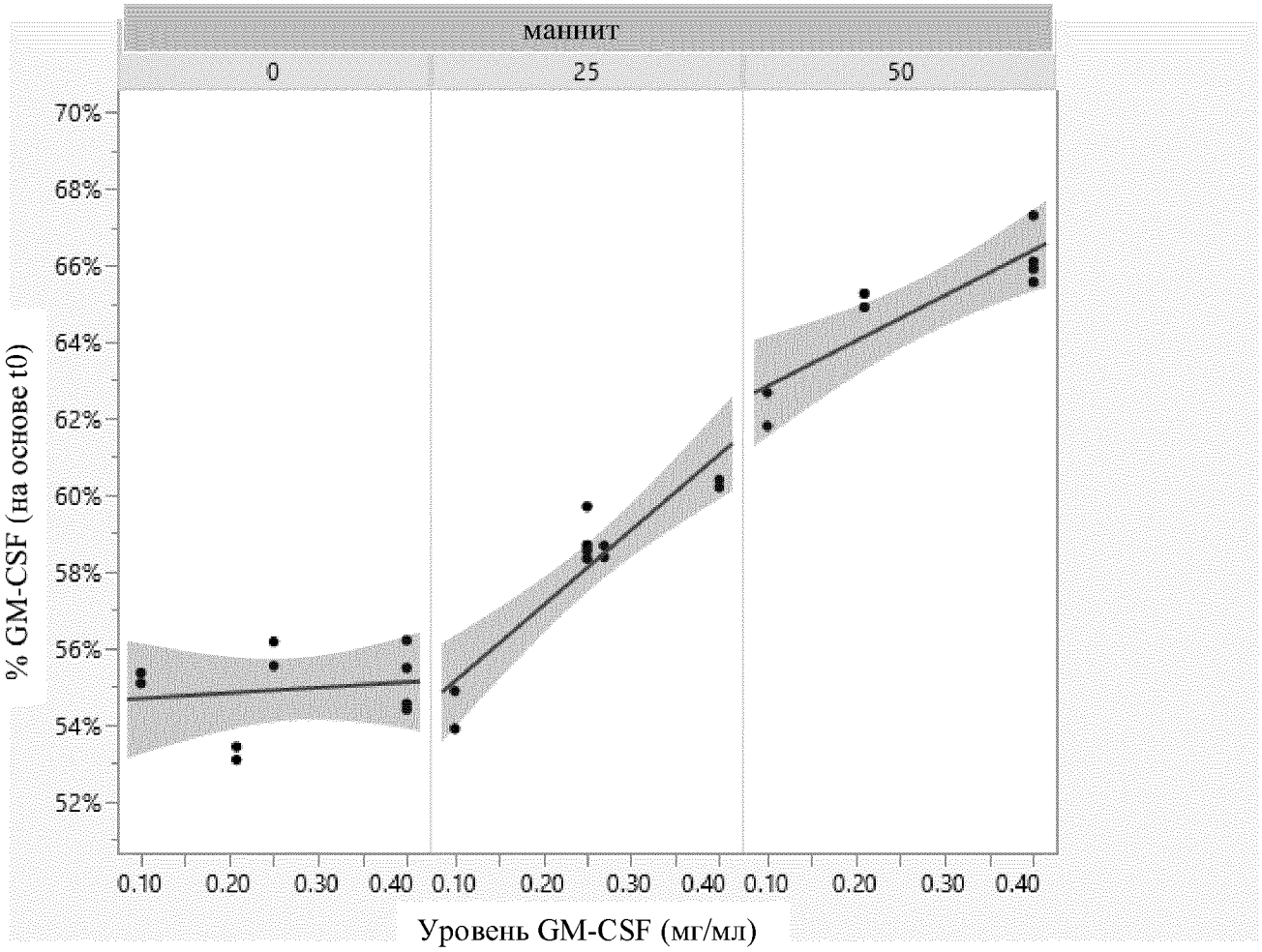
29. Состав рекомбинантного человеческого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rhGM-CSF) для введения в легкие, содержащий rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин и воду.

30. Способ доставки rhGM-CSF в легкие, включающий распыление жидкого состава rhGM-CSF, где жидкий состав содержит rhGM-CSF, сахарный спирт или сахар, альбумин и воду, посредством чего указанный rhGM-CSF доставляется в легкие.

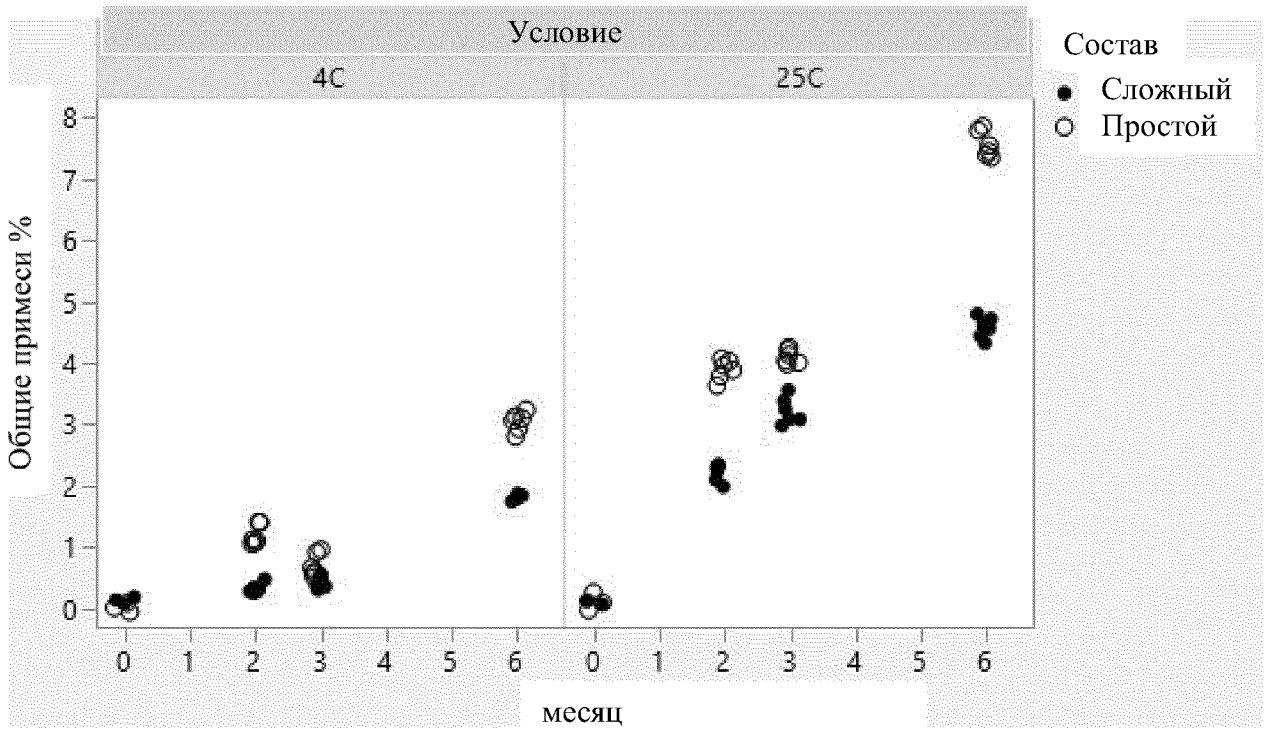
Фиг. 1


68%
66%
64%
62%
60%
58%
56%
54%
52%
% GM-CSF (на основе t0)
0
10
20
30
40
50
маннит (мг/мл)

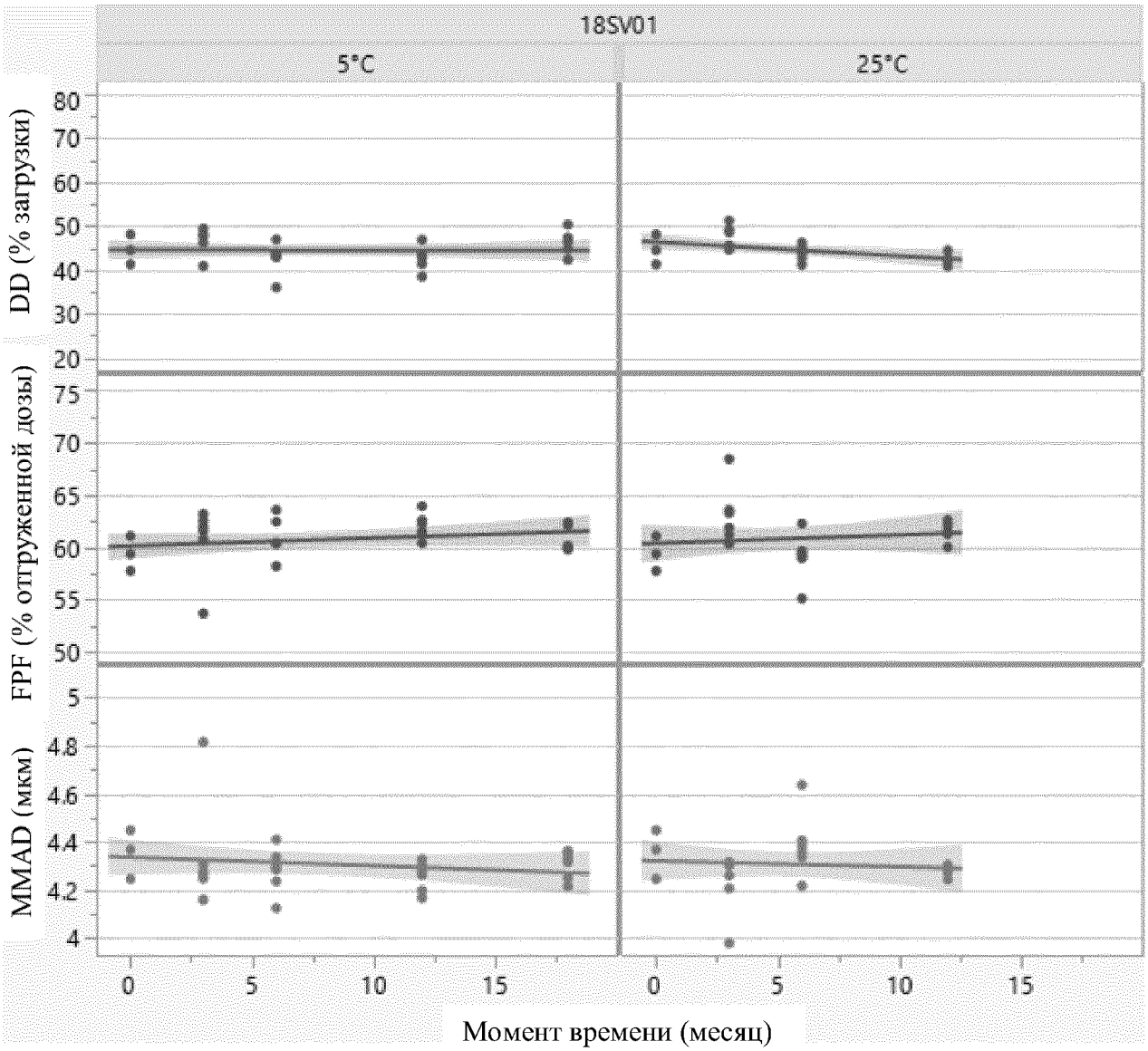
Фиг. 2


маннит
0
25
50
70%
68%
66%
64%
62%
60%
58%
56%
54%
52%
% GM-CSF (на основе t0)
0.10
0.20
0.30
0.40
0.10
0.20
0.30
0.40
0.10
0.20
0.30
0.40
Уровень GM-CSF (мг/мл)

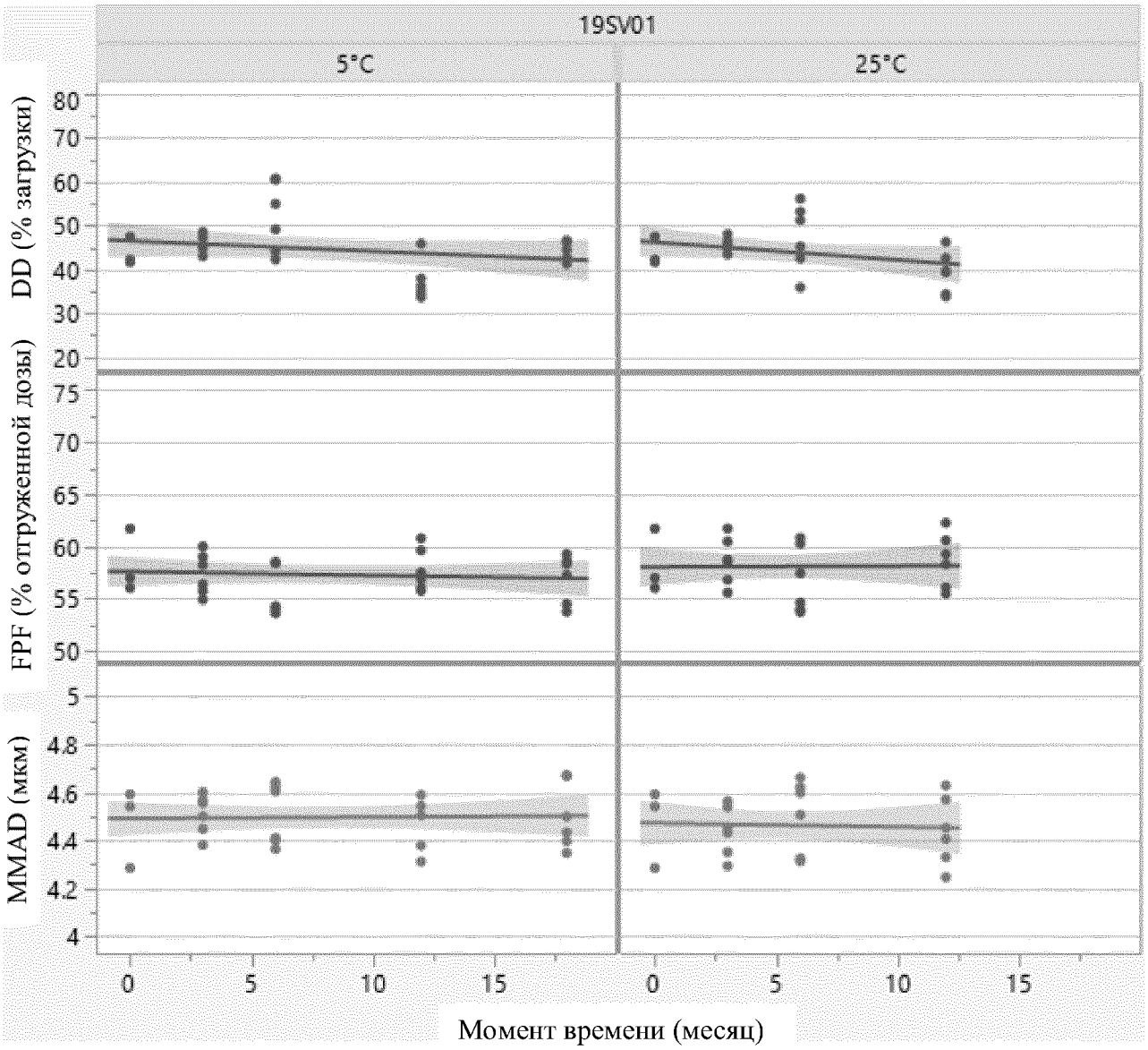
Фиг. 3


Условие
4C
25C
Состав
Сложный
Простой
Общие примеси %
0
1
2
3
4
5
6
7
8
месяц

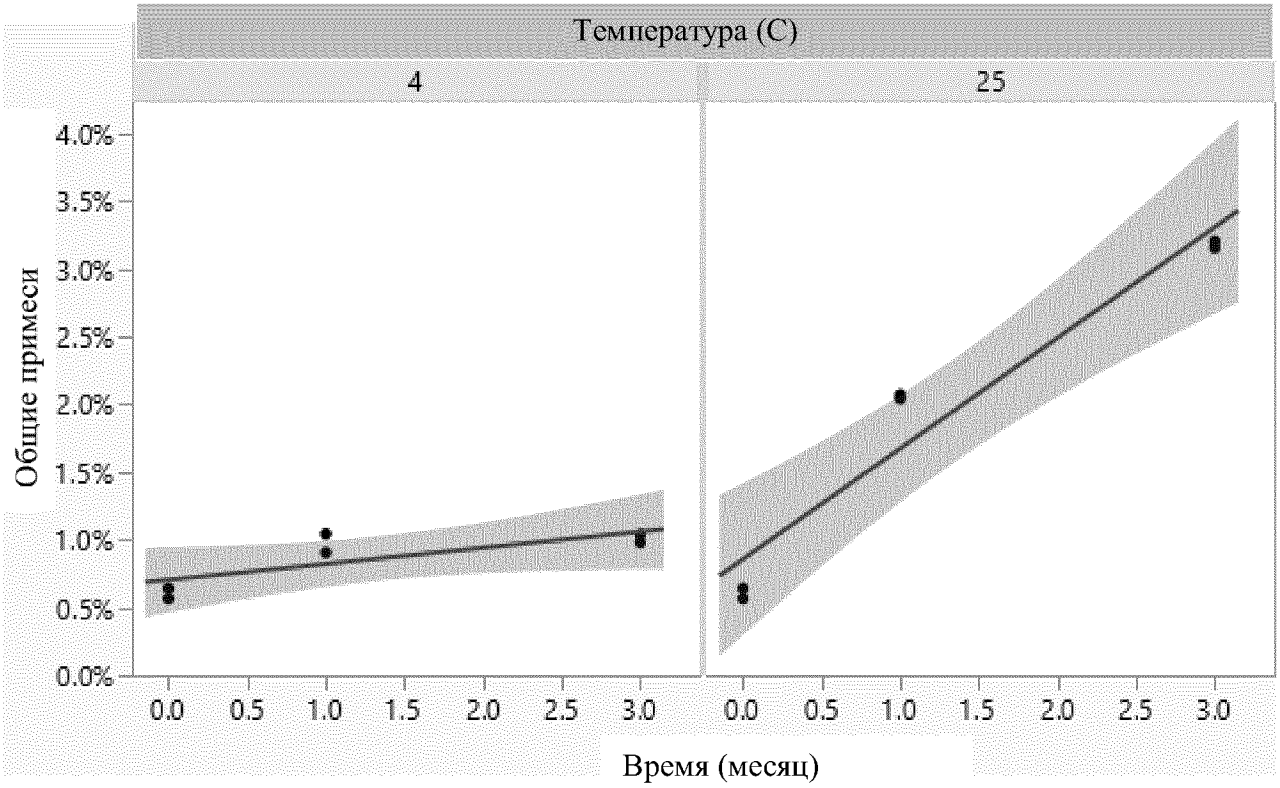
Фиг. 4A


18SV01
5°C
25°C
DD (% загрузки)
80
70
60
50
40
30
20
FPF (% отгруженной дозы)
75
70
65
60
55
50
MMAD (мкм)
5
4.8
4.6
4.4
4.2
4
0
5
10
15
Момент времени (месяц)

Фиг. 4B


19SV01
5°C
25°C
DD (% загрузки)
FPF (% отгруженной дозы)
MMAD (мкм)
80
70
60
50
40
30
20
75
70
65
60
55
50
5
4.8
4.6
4.4
4.2
4
0
5
10
15
Момент времени (месяц)

Фиг. 5


Температура (C)
4
25
Общие примеси
4.0%
3.5%
3.0%
2.5%
2.0%
1.5%
1.0%
0.5%
0.0%
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
Время (месяц)