

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390382 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.05

(51) Int. Cl. A61L 29/00 (2006.01)
A61L 15/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.08.06

(54) ПРЕПАРАТ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

(31) 63/063,770

(32) 2020.08.10

(33) US

(86) PCT/EP2021/071977

(87) WO 2022/033969 2022.02.17

(71) Заявитель:

КЪЕЗИ ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:

Ановер Раи Антони Мина (IT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к стабильным препаратам тканевого активатора плазминогена (tPA). В частности, изобретение относится к специфическим новым препаратам, способам их приготовления и способам их применения.

202390382

A1

A1

202390382

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577128EA/030

ПРЕПАРАТ ТКАНЕВОГО АКТИВАТОРА ПЛАЗМИНОГЕНА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к стабильным препаратам тканевого активатора плазминогена (tPA). В частности, изобретение относится к специфическим новым препаратам, способам их приготовления и способам их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Активаторы плазминогена (РА) являются эндогенными сериновыми протеазами, участвующими в каскаде реакций, приводящих к растворению кровяных сгустков. Данные белки подразделяются на две отдельные группы: активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и тканевой активатор плазминогена (tPA) (Nguyen et al., 1993, in *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, Plenum Press, New York). Тканевой активатор плазминогена (tPA), в частности, является белком, участвующим в разрушении кровяных сгустков. Он представляет собой сериновую протеазу (ЕС 3.4.21.68), находящуюся на эндотелиальных клетках, т.е. клетках, которые выстилают кровеносные сосуды. Будучи ферментом, он катализирует превращение плазминогена в плазмин, главный фермент, ответственный за разрушение сгустков. Человеческий tPA имеет молекулярную массу ~70 кДа в одноцепочечной форме.

Рекомбинантные tPA включают в себя алтеплазу (Nguyen et al., 1993, in *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, Plenum Press, New York), ретеплазу: рекомбинантный мутант алтеплазы с более длительным временем «полужизни» *in vivo*, чем алтеплаза (N. Engl. J. Med, 1997, vol. 337, p. 1118-1123), тенектеплазу (Dillon et al., там же) и десмотеплазу (Li et al., 2017, *Medicine (Baltimore)*, vol. 96, e6667).

Рекомбинантные tPA были разработаны в качестве лекарственных препаратов, пригодных для тромболиза. В частности, рекомбинантные tPA разработаны для лечения или предотвращения некоторых заболеваний, которые характеризуются кровяными сгустками, такими как легочная эмболия, инфаркт миокарда и инсульт. Широко применяются против ишемического инсульта. Рекомбинантные tPA можно вводить системно, например, в случае острого инфаркта миокарда или острого ишемического инсульта, или можно вводить через артериальный катетер непосредственно в место закупорки в случае некоторых тромбов. Дозы, рекомендуемые для введения, обычно значительно различаются при системном введении и локальном введении, например, посредством катетера.

Подобно многим другим биологически активным ингредиентам, рекомбинантные tPA обычно характеризуются неудовлетворительной долгосрочной стабильностью при комнатной температуре. Действительно, многие биологически активные ингредиенты вообще предрасположены к нежелательной нестабильности, в том числе, деградации, при хранении в жидких формах, например, жидких растворах. Это ставит задачу не только

обеспечения готовых к применению препаратов из таких биологически активных ингредиентов, но может быть также связано с неблагоприятными условиями во время производства и хранения таких биологических препаратов. Рекомбинантные tPA в форме пригодных для использования стабильных жидкостей и/или, иначе, в форме, стабильной при комнатной температуре, еще не созданы; они обычно предоставляются для продажи в лиофилизированной форме (лиофилизат), которую обычно необходимо хранить при температурах холодильного хранения. Лيوфилизированный препарат Cathflo, например, следует хранить при температурах холодильного хранения (2°C-8°C/36°F-46°F). Препарат Cathflo следует восстанавливать непосредственно перед использованием.

Было бы желательно получить стабильную композицию рекомбинантного tPA, которую можно хранить и промышленно производить при комнатной температуре. Желательно также, чтобы такую специфическую стабильную композицию рекомбинантного tPA можно было удобно изготавливать и приготавливать согласно рецептуре без претерпевания нежелательной деградации в ходе производственного процесса. Желательно также получать препарат tPA, который можно легко использовать, например, после восстановления, в таких катетерах, как устройства венозного доступа.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новаторским препаратам тканевого активатора плазминогена (tPA), которые стабильны при хранении и/или под действием стрессовых условий, и которые пригодны для лечения пациента с закупоренными катетерами. В частности, содержание tPA в препаратах по настоящему изобретению является таким, что жидкий препарат, описанный в настоящей заявке, можно непосредственно вводить по каплям в закупоренный катетер пациента, что способствует устранению закупоривания катетера.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции, содержащей:

- i. приблизительно 0,15-0,25 единиц (Е)/мл тканевого активатора плазминогена (tPa),
 - ii. приблизительно от 1 мМ до 10 мМ транексамовой кислоты,
 - iii. приблизительно 2,5-5,0% (по массе) сахарозы; (предпочтительно приблизительно 3,0% (по массе),
- при этом препарат имеет уровень pH 6,0-8,0, предпочтительно 7,0-8,0, предпочтительно 7,5.

При необходимости, в упомянутой композиции содержатся также неионное поверхностно-активное вещество и буферное средство для поддержания уровня pH. Такая композиция определяется как имеющая следующий состав:

- i. приблизительно 0,15-0,25 единиц (Е)/мл тканевого активатора плазминогена (tPa),
- ii. приблизительно от 1 мМ до 10 мМ транексамовой кислоты,
- iii. приблизительно 2,5-5,0% (по массе) сахарозы; (предпочтительно

приблизительно 3,0% (по массе),

iv. при необходимости, неионное поверхностно-активное вещество,

v. при необходимости, буферное средство для поддержания уровня pH;

при этом препарат имеет уровень pH 6,0-8,0, предпочтительно 7,0-8,0, предпочтительно 7,5.

Во втором аспекте изобретение относится к по существу безводной композиции, получаемой обезвоживанием композиции по первому аспекту, предпочтительно посредством лиофилизации.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, имеющего катетер с нарушенной функциональностью, при этом способ отличается тем, что жидкий препарат по первому аспекту настоящего изобретения вводится по каплям в закупоренный катетер пациента. Катетер предпочтительно является устройством центрального венозного доступа (УЦВД), и композиция вводится по каплям непосредственно в УЦВД.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится также к набору, содержащему по существу безводную композицию по первому аспекту, а также воду для восстановления.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится также к способу получения композиции по первому аспекту, при этом способ по существу состоит в добавлении воды в композицию по второму аспекту.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится также к применению композиции по первому и второму аспектам с целью восстановления функциональности катетера.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее описание в целом, вместе с формулой изобретения и фигурами, раскрывает конкретные и/или предпочтительные варианты осуществления и варианты отдельных признаков изобретения. Настоящее изобретение также предполагает, в качестве особенно предпочтительных вариантов осуществления, такие варианты осуществления, которые образованы сочетанием двух или более из конкретных и/или предпочтительных вариантов осуществления, и варианты, описанных в настоящей заявке на настоящее изобретение. Таким образом, настоящее изобретение также включает в себя все объекты, соединения, признаки, этапы, способы, детали введения или композиций, упоминаемые или указанные в настоящем описании, по отдельности или совместно, и все возможные комбинации или любые два или более из упомянутых объектов, соединений, признаков, этапов, способов, деталей введения или композиций. Таким образом, если особо не указано иное в настоящей заявке, или иное не требуется по контексту, то следует считать, что ссылка на единственный объект, соединение, признак, этап, способ, деталь введения или композицию охватывает один и множество (т.е. более одного, например, два или более, три или более или все) из таких объектов, соединений, признаков, этапов, способов, деталей введения или композиций. Если особо не установлено иное, или иное

не требуется по контексту, то каждый вариант осуществления, аспект и пример, раскрытые в настоящей заявке, следует считать применимым к и объединяемым с любым другим вариантом осуществления, аспектом или примером, раскрытыми в настоящей заявке.

Среднему специалисту в данной области будет очевидно, что изобретение, описанное в настоящей заявке, допускает видоизменения и модификации, отличающиеся от тех, которые конкретно описаны. Таким образом, настоящее изобретение не ограничено по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке, которые представлены в настоящей заявке в целях иллюстрации и пояснения на примерах. Функционально или иначе эквивалентные объекты, соединения, признаки, этапы, способы, детали введения или композиции находятся в пределах объема настоящего изобретения. Среднему специалисту в данной области будет очевидно, что настоящее изобретение включает в себя все видоизменения и модификации объектов, соединений, признаков, этапов, способов, деталей введения или композиций, точно описанных в настоящей заявке.

Каждая из ссылок, приведенных в настоящей заявке выше или далее, (в том числе, все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции, презентации и т.п.) включена в полном объеме в настоящую заявку путем отсылки. Ничто из содержащегося в настоящей заявке не следует толковать как признание того факта, что настоящее изобретение не будет вправе датировать задним числом подачу заявки на конкретный принцип, и/или как признание того факта, что конкретная ссылка, если не считать общедоступных сведений, будет содержать информацию, достаточно четкую и полную для осуществления специалистом в данной области без чрезмерного бремени доказывания.

В общем, если не дано иного специального определения, то все технические и научные термины, применяемые в настоящей заявке, имеют то же самое значение, которое обычно понятно среднему специалисту в данной области (например, в генетике, молекулярной биологии, экспрессии генов, цитологии, культивировании клеток, иммунологии, медицине, хроматографии, химии белков и биохимии). Учебные пособия и обзорные статьи, опубликованные, например, на английском языке, обычно определяют значение как обычно понимаемое средним специалистом в данной области.

Выражение «и/или», например, «X и/или Y», следует понимать как означающее либо «X и Y», либо «X или Y» и следует считать представляющим явное указание на «и», «или» или оба значения («и» или «или»).

При использовании по тексту настоящей заявки, если не установлено иное, то термины «приблизительно», «около» и «по существу» означают каждый приблизительно или около и, в связи с числовым значением или диапазоном, приведенным в настоящей заявке, предпочтительно означает +/-10%, предпочтительнее +/-5%, еще предпочтительнее +/-2%, еще более предпочтительно +/-1%, от перечисленного или заявленного числового значения или диапазона. «По существу», при использовании в связи с отсутствием

конкретного признака, этапа, интервала времени или чего-то подобного, обычно означает, что изобретение осуществляется таким образом, что соответствующий признак, этап, интервал времени или что-то подобное почти отсутствует или не отклоняется от необходимого минимума при работе.

Если явно не установлено иное, то выражение «содержать» или его видоизменения, такие как «содержит» или «содержащий», применяется(ются) в контексте настоящего документа для указания, что, кроме элементов списка, введенного словом «содержащий», при необходимости могут присутствовать дополнительные элементы. Однако, в качестве конкретного варианта осуществления настоящего изобретения предполагается, что термин «содержащий» включает возможность отсутствия дополнительных элементов, т.е. в целях данного варианта осуществления термин «содержащий» следует понимать как имеющий значение «состоящий из».

Если явно не установлено иное, то все указания относительных количеств, относящихся к настоящему изобретению, приведены как соотношения по массе. Указания относительных количеств компонента, характеризуемого общим термином, должны относиться к суммарному количеству всех конкретных вариантов или элементов, охватываемых упомянутым общим термином. Если некоторый компонент, описываемый общим термином, определяется как присутствующий в некотором относительном количестве, и если данный компонент дополнительно характеризуется как конкретный вариант или элемент, охватываемый общим термином, то предполагается, что никакие другие варианты или элементы, охватываемые общим термином, не присутствуют дополнительно в таком количестве, что суммарное относительное количество компонентов, охватываемых общим термином, превосходит установленное относительное количество; еще предпочтительнее то, что никакие другие варианты или элементы, охватываемые общим термином, не присутствуют совсем.

Определение тканевой активатор плазминогена (tPA), при использовании по тексту настоящей заявки, относится к сериновой протеазе, способной катализировать превращение плазминогена в плазмин. Фермент tPA пригоден для катализирования разрушения фибриновых сгустков (фибринолиза). Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, предполагается, что tPA направлено действует на фибрин (который вызывает свертывание крови) путем растворения тромба (кровяного сгустка). В организме человека, например, tPA обнаруживается на эндотелиальных клетках (клетках, которые выстилают кровеносные сосуды), но термин не ограничен человеческим происхождением. При использовании по тексту настоящей заявки, термин tPA охватывает tPA человеческого и нечеловеческого происхождения. Белок tPA может быть рекомбинантным или нет.

При использовании по тексту настоящей заявки, термин рекомбинантный tPA относится к любому тканевому активатору плазминогена, который был экспрессирован рекомбинантным путем или может быть получен из рекомбинантного источника. Рекомбинантный tPA включает в себя, без ограничения, алтеплазу (Dillon et al., 2019, Adv.

Emerg. Nurs. J., vol. 41, p. 271-278), ретеплазу (Dillon et al., 2019, там же), тенектеплазу (Dillon et al., там же), дутеплазу (Kalbfleisch et al., 1992, Am. J. Cardiol., vol. 69, p. 1120-1127) и десмотеплазу (Li et al., 2017, Medicine (Baltimore), vol. 96, e6667).

При использовании по тексту настоящей заявки, активный фармацевтический ингредиент означает субстанцию, пригодную для применения при изготовлении лекарственного средства (лекарственного препарата), и которая, при использовании в производстве лекарства, становится активным ингредиентом лекарственного средства.

В настоящей заявке термин активный ингредиент применяется для ссылки на любой компонент лекарственного средства, пригодный для обеспечения фармакологической активности или другого прямого эффекта при диагностике, излечении, облегчении, лечении или профилактике заболевания или для воздействия на структуру или любую функцию организма людей или животных. Активные ингредиенты включают в себя такие компоненты лекарственного средства, которые могут претерпевать химическое изменение в процессе изготовления лекарственного средства и присутствовать в лекарственном средстве в модифицированной форме, предназначенной для обеспечения заданной(ого) активности или эффекта.

В контексте настоящего изобретения, предпочтительный активный ингредиент выбирается из тромболитических средств, полученных из человеческого тканевого активатора плазминогена. Наиболее предпочтительным активным ингредиентом является ретеплаза (Wooster et al., 1999, Ann. Pharmacother., vol 33, p. 318-324).

При использовании по тексту настоящей заявки, термин лекарственное средство обычно относится к готовому лекарственному средству, например, таблетке, капсуле, порошку или раствору, которое содержит активный фармацевтический ингредиент, обычно, но не обязательно, в сочетании с неактивными ингредиентами. В конкретном контексте термин лекарственное средство относится к композиции по первому аспекту и/или к композиции по второму аспекту настоящего изобретения.

Термин лекарственная субстанция применяется равноправно с термином активный ингредиент.

В соответствии с настоящим изобретением предлагаются конкретные композиции, содержащие тканевой активатор плазминогена (tPA). Таким образом, конкретно в контексте настоящего изобретения, tPA может также называться лекарственной субстанцией.

При ссылке на композиции tPA, термины «препарат» и «композиция» могут применяться равноправно и определять композиции в любом агрегатном состоянии, которые содержат tPA плюс одно или более вспомогательных веществ, например, описанных в общем в настоящей заявке.

В частности, настоящее изобретение относится к препарату тканевого активатора плазминогена (tPA). В настоящей заявке предложено несколько вариантов осуществления такой композиции. В своей по существу безводной форме, например, лиофилизированной форме, препарат является стабильным при комнатной температуре. По существу

безводный препарат можно получать, например, лиофильной сушкой жидкого препарата. Упомянутый жидкий препарат является стабильным к воздействию стрессовых условий, часто встречающихся при промышленном производстве биофармацевтических препаратов, например, к воздействию заморозания-оттаивания, в частности. Таким образом, принимая во внимание все данные преимущества в совокупности, пара из по существу безводного препарата, который является стабильным при хранении, и жидкого препарата, который устойчив к стрессовым воздействиям при обработке в процессе производства, обеспечивают совместно подходящий фармацевтический препарат, который можно легко приготовить. Изобретение предлагает также способ лечения пациента, испытывающего нарушение функциональности устройства центрального венозного доступа (УЦВД), заключающийся во введении пациенту жидкой композиции по настоящему изобретению. Для такой цели, по существу безводный препарат по изобретению можно восстанавливать водой.

В общем, упоминается ли конкретно или нет, во всех аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения обычно предпочтительно, чтобы вода была водой высокой степени чистоты, предпочтительнее водой для инъекций (WFI). В частности, предпочтительна стерильная вода для инъекций (sWFI).

В настоящем изобретении активный фармацевтический ингредиент tPA (например, ретеплаза) приготовлен по рецептуре в виде композиции, содержащей сахарозу и транексамовую кислоту, как описано в настоящей заявке. В частности, tPA в настоящей заявке предпочтительно приготовлен по рецептуре в системе вспомогательных веществ, содержащей транексамовую кислоту (ТА), фосфат и сахарозу (совместно: компоненты TAPS). Хотя TAPS-содержащие препараты ретеплазы прежде были известны (смотри сравнительный пример 3), препарат по настоящему изобретению является не только особенно стабильным как в жидкой, так и в по существу безводной форме, при соотношении компонентов, полностью отличающемся от известного прежде соотношения компонентов (сравнительный пример 3), но также пригодным для прямого закапывания в катетеры, без необходимости разведения. Композиции по настоящему изобретению заметно отличаются от известных композиций tPA, в частности, по отношению долей tPA к другим составляющим композиции.

ЖИДКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции содержащей:

- i. приблизительно 0,15-0,25 единиц (Е)/мл тканевого активатора плазминогена (tPA),
- ii. приблизительно от 1 мМ до 10 мМ транексамовой кислоты,
- iii. приблизительно 2,5-5,0% (по массе) сахарозы; (предпочтительно приблизительно 3,0% (по массе),

при этом препарат имеет уровень pH 6,0-8,0, предпочтительно 7,0-8,0, предпочтительно 7,5.

При необходимости, в упомянутой композиции содержатся также неионное поверхностно-активное вещество и буферное средство для поддержания уровня pH. Такая композиция определяется как имеющая следующий состав:

- i. приблизительно 0,15-0,25 единиц (Е)/мл тканевого активатора плазминогена (tPA),
 - ii. приблизительно от 1 mM до 10 mM транексамовой кислоты,
 - iii. приблизительно 2,5-5,0% (по массе) сахарозы; (предпочтительно приблизительно 3,0% (по массе)),
 - iv. при необходимости, неионное поверхностно-активное вещество,
 - v. при необходимости, буферное средство для поддержания уровня pH;
- при этом препарат имеет уровень pH 6,0-8,0, предпочтительно 7,0-8,0, предпочтительно 7,5.

Далее приведено краткое описание отдельных составляющих и их соотношение и значимость.

Жидкая композиция обычно содержит воду в качестве жидкости. Жидкий препарат является предпочтительно жидким препаратом на водной основе.

В одном варианте осуществления упомянутая композиция является жидкой. В другом варианте осуществления упомянутую композицию замораживают. Температура замороженной композиции предпочтительно находится в диапазоне от -10 до -80 градусов Цельсия, например, приблизительно равна -20 градусов Цельсия.

Рекомбинантный тканевой активатор плазминогена

Рекомбинантный тканевой активатор плазминогена (rtPA) является рекомбинантной формой тканевого активатора плазминогена (tPA) и может также упоминаться как tPA.

В настоящей заявке rtPA может также называться АФИ (активный фармацевтический ингредиент). Белок tPA, пригодный для применения в композициях по настоящему изобретению, конкретно не ограничен и включает в себя все известные tPA, рекомбинантный или другой, включая алтеплазу (Nguyen et al., 1993, in *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, Plenum Press, New York), ретеплазу: рекомбинантный мутант алтеплазы с более длительным временем полужизни in vivo, чем алтеплаза (N. Engl. J. Med, 1997, vol. 337, p. 1118-1123), тенектеплазу (Dillon et al., там же), тенектеплазу и десмотеплазу (Li et al., 2017, *Medicine (Baltimore)*, vol. 96, e6667).

В продаже имеются коммерческие препараты rtPA, но данные препараты не соответствуют настоящему изобретению (сравнительные примеры 1, 2 и 3).

Предпочтительные tPA в настоящем изобретении включают в себя алтеплазу и ретеплазу, при этом ретеплаза особенно предпочтительна. Ретеплаза является отдельным rtPA и наиболее предпочтительным rtPA в настоящей заявке. Структура, функционирование и производство ретеплазы всесторонне описаны в литературе, смотри, например, Muhammadi et al., 2019, *Adv. Biomed. Res.* Vol. 8, 19. В некоторых вариантах

осуществления препараты по настоящему изобретению можно получать из ретеплазы, как поясняется в сравнительном примере 3 (Ретаваза) или из лекарственной субстанции ретеплазы.

Тканевой активатор плазминогена (tPA) предпочтительно является ретеплазой. Предпочтительнее, в соответствии с первым аспектом, ретеплаза содержится в количестве около 0,2 единиц (Е)/мл. Иначе говоря, предпочтительно, чтобы tPA, предпочтительно ретеплаза, присутствовал в концентрации от приблизительно 0,3 мг/мл до приблизительно 0,4 мг/мл и предпочтительнее около 0,35 мг/мл.

Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, предполагается, что tPA целенаправленно действует на фибрин (который вызывается свертывание крови) и растворяет тромб (кровяной сгусток). При введении, как описано в настоящей заявке, препараты, описанные в настоящей заявке, применяются для восстановления функции устройства центрального венозного доступа (УЦВД) в пациента. В общем, tPA, например, алтеплаза и ретеплаза, являются высокоспецифичными в отношении фибрина. Таким образом, в предпочтительном варианте, tPA, содержащийся в композиции по настоящему изобретению воздействует конкретно на сгустки с высоким содержанием фибрина в закупорке катетера.

Транексамовая кислота

Как экспериментально доказано в настоящей заявке, транексамовая кислота оказывает благоприятное влияние на термодинамическую стабильность ретеплазы (смотри пример 1). Термодинамическая стабильность повышается при повышении концентрации транексамовой кислоты. В частности, могут быть полезны повышенные концентрации транексамовой кислоты (смотри пример 1). Однако, стабильность наблюдается уже при концентрациях всего 1 мМ. Поэтому, особенно предпочтительное содержание транексамовой кислоты в жидком препарате по первому аспекту составляет около 1 мМ.

Сахароза

Как показано в настоящем изобретении, повышенные уровни сахарозы, по-видимому, оказывали несколько благоприятное влияние (пример 1), но очень высокий уровень сахарозы (8%) мог усложнять процесс лиофилизации, не обеспечивая никакого дополнительного благоприятного влияния (пример 2).

Для эффективной лиофилизации, вариант препарата с 3% сахарозы является наиболее подходящим для усовершенствования (смотри пример 4).

Относительное количество сахарозы, в отношении к tPA, по настоящему изобретению заметно отличается от относительного количества сахарозы, в отношении к tPA, известного в данной области (смотри, например, пример 6). Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, предполагается, что это особенно важно для обеспечения преимуществ стабильности препаратов по настоящему изобретению.

Неионное поверхностно-активное вещество

Жидкая композиция по первому аспекту предпочтительно содержит неионное

поверхностно-активное вещество. Неионное поверхностно-активное вещество предпочтительно является полисорбатом 80 (PS80). Предпочтительная концентрация PS80 в жидком препарате составляет приблизительно от 0,001 (по массе) до 0,1% (по массе), предпочтительнее около 0,01% (по массе), еще предпочтительнее около 0,02% (по массе), предпочтительно около 0,03% (по массе), предпочтительно около 0,04% (по массе), предпочтительно около 0,045% (по массе), предпочтительно около 0,06% (по массе), предпочтительно около 0,0675% (по массе), предпочтительно около 0,07% (по массе), предпочтительно около 0,08% (по массе), предпочтительно около 0,09% (по массе).

Уровень pH

Уровень pH жидкой композиции по первому аспекту находится предпочтительно в диапазоне 6,0-8,0, предпочтительно 7,0-8,0, еще предпочтительнее 7,5. Как экспериментально показано, изменение pH в сторону более высоких значений (pH 7,5) четко продемонстрировало благоприятное влияние на коллоидальную стабильность (смотри пример 1).

Для этого жидкая композиция предпочтительно содержит также буферное средство для поддержания уровня pH. Предпочтительнее, упомянутое буферное средство для поддержания уровня pH является буферной системой фосфата калия. Предпочтительные концентрации калия содержат диапазон 20-30 мМ калия, предпочтительнее около 26 мМ калия, с соответствующим количеством противоиона калия для гарантированного сохранения уровня pH в вышеуказанном диапазоне. Например, концентрации фосфата калия содержат диапазон 20-30 мМ фосфата калия, предпочтительнее около 26 мМ фосфата калия.

Предпочтительное преимущество жидкой композиции по первому аспекту заключается в том, что упомянутая композиция является стабильной, например, при температурах холодильного хранения в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев.

Жидкий препарат является также стабильным при стрессовом воздействии заморзания-оттаивания. Следовательно, при необходимости, жидкий препарат можно замораживать и оттаивать несколько раз. Это свойство очень полезно в процессе производства и допускает хранение в замороженном состоянии как нерасфасованного продукта, так и расфасованных по аликвотам образцов, например, во флаконах, предусмотренных в настоящей заявке, при этом оттаивание и повторное замораживание возможны без ущерба для качества.

Приготовление жидких препаратов

Даже несмотря на возможность межсерийной изменчивости биоактивности субстанций tPA, подлежащих использованию в препаратах из композиций по настоящему изобретению, конкретное количество tPA регулируется в ходе производственного процесса, чтобы число единиц в каждом флаконе всегда было в пределах по настоящему изобретению. Иначе говоря, даже если будет иметь место межсерийная изменчивость фибринолитической активности, это не составит проблему, поскольку эта активность

будет соответственно регулироваться/приготавливаться по рецептуре на последующих этапах изготовления перед наполнением флаконов (аликвот) и лиофилизации.

Аликвоты

В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция содержится в одноразовом флаконе, называемом также «аликвота». Одноразовый флакон, наполненный композицией по настоящему изобретению, может также называться композицией с однократной дозировкой или единицей дозирования.

В частности, количество tPA в препаратах по настоящему изобретению является таким, что жидкий препарат, описанный в настоящей заявке, можно непосредственно вводить по каплям в закупоренный катетер пациента, что способствует устранению закупоривания катетера.

Препарат по настоящему изобретению предпочтительно расфасовывают на аликвоты так, чтобы аликвота содержала 0,4 единицы фибринолитической активности в каждом флаконе препарата по настоящему изобретению.

Такой одноразовый флакон, содержащий жидкий препарат, можно получать заполнением флакона жидким препаратом, или, в качестве альтернативы, добавлением воды в по существу безводный препарат по второму аспекту изобретения, который будет описан далее.

Некоторые преимущества жидкого препарата

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к жидкой композиции, описанной в настоящей заявке.

Химическая деградация жидкой формы выпуска лекарственного средства (DP) не наблюдалась для образцов, подвергнутых стрессовому воздействию заморозания-оттаивания (смотри также, например, пример 2), что объясняет пригодность для лиофилизированной формы выпуска лекарственного средства. Иначе говоря, жидкий препарат является стабильным при стрессовом воздействии заморозания-оттаивания, что представляет основное преимущество в процессе производства, когда циклы заморозания-оттаивания являются часто повторяющимся этапом в процессе производства.

Амидолитическая активность tPA остается по существу неизменной при воздействии заморозания-оттаивания (смотри, например, пример 2).

Чтобы связать некоторые преимущества жидкого препарата с общим контекстом, нужно обратить внимание, среди прочего, на следующие вопросы.

Во-первых, в общем, деградация белковых молекул происходит медленнее при пониженных температурах; следовательно, хранение при пониженной температуре предпочтительно во многих случаях для продления срока годности. В частности, принято считать, что хранение при температурах ниже нуля снижает возможные риски, связанные с хранением жидкостей, такие как деградация и стрессовые условия транспортировки, что делает его подходящим вариантом для длительного хранения (Rayfield et al., 2017, J. Pharm Sci., vol. 106, p. 1944-1951).

Однако замедленные скорости заморозания и оттаивания, особенно в больших

контейнерах для хранения (>2 л), может приводить к более значительному криоконцентрированию (т.е. вытеснению молекул растворенного вещества), что имеет следствием образование зон повышенных концентраций белка и вспомогательных веществ и изменений требуемой концентрации препарата, уровня pH и вспомогательного вещества. Данные условия могут негативно повлиять на качество продукции. Таким образом, замерзание и оттаивание обычно может ухудшать целевой профиль препарата.

Хотя замерзание-оттаивание обычно применяется при хранении лекарственной субстанции, данный цикл может также иметь большое значение для лекарственного средства (готового фармацевтического препарата), например, для клинического лекарственного средства, чтобы обеспечивать потенциально продолжительные клинические испытания (Ho et al., 2008, Am. Pharmaceut. Rev., p. 1-6).

Таким образом, тот факт, что композиция по первому аспекту является стабильной под действием циклов замерзания-оттаивания, связан с несколькими преимуществами, которые невозможно было бы спрогнозировать среднему специалисту в данной области.

Кроме того, как также подробно описано далее в настоящей заявке, из жидкой композиции по настоящему изобретению также можно легко получить по существу безводную композицию по настоящему изобретению, например, посредством лиофилизации, как описано в примере 4. В свою очередь, жидкую композицию по настоящему изобретению можно непосредственно получать из по существу безводной композиции по настоящему изобретению, например, посредством добавления жидкости, предпочтительно воды, предпочтительнее воды для инъекций. В наиболее предпочтительном варианте жидкость для добавления является стерильной водой для инъекций.

Жидкие препараты

Для получения 0,4 единиц фибринолитической активности в каждом флаконе с препаратами по настоящему изобретению, ретеплазу (смотри сравнительный пример 3) нужно будет разводить с каждым вспомогательным веществом в количестве, зависящем от первоначальной фибринолитической активности данной конкретной серии. Для наглядности, если активный фармацевтический ингредиент (АФИ) в форме ретеплазы может быть в диапазоне 0,679-0,721 мг, то для вспомогательных веществ могут подходить следующие расчетные диапазоны.

Ретеплаза: 0,7 мг (возможный диапазон, при организации промышленного производства: 0,679-0,721 мг, то есть $\pm 3\%$). При использовании тех же $\pm 3\%$, диапазон содержания вспомогательных веществ возможно будет составлять,

Транексамовая кислота: 1 мМ (целевое значение 1 мМ=0,31 мг, диапазон: 0,30-0,32 мг)

Сахароза: 3% (целевое значение $3\%=61$ мг, диапазон: 59-63 мг)

Полисорбат 80: 0,001-0,09% (например, при 1,9 мг, диапазон: 1,84-1,96 мг)

Вторичный кислый фосфат калия: целевое значение 8,36 мг, диапазон: 8,11-8,61 мг

Фосфорная кислота: целевое значение 0,69 мг, диапазон: 0,67-0,71 мг

В одном варианте осуществления упомянутая композиция является жидкой. В другом варианте осуществления упомянутая композиция является замороженной. Предпочтительная температура замороженной композиции приблизительно равна -20 градусов Цельсия.

ПО СУЩЕСТВУ БЕЗВОДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ

Во втором аспекте изобретение относится к по существу безводной композиции, получаемой обезвоживанием композиции по первому аспекту, предпочтительно посредством лиофилизации.

Таким образом, кроме отличия по содержанию жидкости, предпочтительно воды, по существу безводная композиция по второму аспекту соответствует жидкой композиции по первому аспекту. Следовательно, и для краткости, характеристики отдельных составляющих такой композиции, например, сахарозы, транексамовой кислоты, неионного поверхностно-активного вещества, уровня pH, буферного средства для поддержания уровня pH, не описываются специально еще раз в настоящей заявке в контексте второго аспекта. Соответствующее раскрытие первого аспекта следует также считать относящимся ко второму аспекту, как если бы оно было также прямо изложено в отношении второго аспекта. Таким образом, все вышеописанные варианты осуществления по первому аспекту могут быть прямо преобразованы в варианты осуществления по второму аспекту, независимо от того, указано ли это прямо в настоящей заявке или нет. Только для пояснения, во втором аспекте предпочтительно, чтобы тканевой активатор плазминогена (tPA) в по существу безводной композиции был ретеплазой. Такую композицию по второму аспекту можно получить, например, лиофильной сушкой композиции с ретеплазой по первому аспекту.

Предпочтительное преимущество по существу безводной композиции по второму аспекту состоит в том, что упомянутая композиция является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев. В еще более предпочтительном варианте, композиция является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 1 года, предпочтительно по меньшей мере двух лет, предпочтительнее по меньшей мере 3 лет. Комнатная температура относится к температурному диапазону от приблизительно 20 до приблизительно 25 градусов Цельсия, например, выбирается из следующих значений: около 20 градусов Цельсия, около 21 градусов Цельсия, около 22 градусов Цельсия, около 23 градусов Цельсия, около 24 градусов Цельсия, около 25 градусов Цельсия.

В общем, стабильность при комнатной температуре можно прогнозировать на основании экспериментально доказанной стабильности в более тяжелых условиях, смотри примеры в настоящей заявке.

По существу безводную композицию по второму аспекту можно получать обезвоживанием жидкого препарата по первому аспекту, как описано, например, в примере 4. Подходящим способом обезвоживания является лиофильная сушка, называемая также лиофилизацией. Композицию обычно будут получать как

лиофилизированную субстанцию (называемую также лиофилизированной массой) во флаконе, который был лиофилизирован. Лيوфилизированная субстанция предпочтительно имеет форму порошка.

По существу безводная композиция по второму аспекту предпочтительно поставляется в одноразовом флаконе. Одноразовый флакон предпочтительно имеет емкость 2-15 мл. Тем самым обеспечивается, что после восстановления упомянутый одноразовый флакон содержит около 2 мл жидкой композиции по первому аспекту. Упомянутый объем пригоден для закапывания, частично или полностью, в катетер пациента, как описано в настоящей заявке. Таким образом, жидкий препарат, полученный восстановлением, не потребует разведения. Это обеспечивает основное преимущество по сравнению с теоретически прогнозируемым использованием коммерческой ретавазы (сравнительный пример 3) для такого медицинского применения, поскольку сначала потребуется значительное разведение коммерческой ретавазы. Для исключения неопределенности, восстановлением называется добавление воды (предпочтительно воды для инъекций) в композицию по второму аспекту, с получением тем самым композиции по первому аспекту.

Лекарственное средство превращают в лиофилизированную форму, чтобы сделать его характеристики стабильными при комнатной температуре. Таким образом, по существу безводная композиция по настоящему изобретению также может называться лекарственным средством. Лекарственное средство обычно потребуется разводить водой, предпочтительно водой для инъекций (WFI), чтобы сделать его пригодным для способа лечения пациента или способа восстановления функциональности катетера, как описано ниже в настоящей заявке.

Таким образом, во втором аспекте настоящее изобретение относится к по существу безводной композиции, описанной в настоящей заявке. Определение «по существу безводная» означает, что содержание воды (по массе) составляет не более 2%, предпочтительно не более 1% (согласно экспериментальному подтверждению смотри, например, пример 5).

Леофилизированная композиция по второму аспекту и по существу безводная композиция по второму аспекту являются непосредственно связанными друг с другом и взаимно обратимыми путем добавления воды или обезвоживания:

1. В одном варианте осуществления по существу безводная композиция по второму аспекту может быть прямо получена (разделением на аликвоты, при необходимости, и) лиофильной сушкой жидкой композиции по первому аспекту настоящего изобретения.

2. В одном варианте осуществления жидкая композиция по первому аспекту может быть прямо получена добавлением воды и восстановлением по существу безводной композиции по второму аспекту настоящего изобретения.

Таким образом, например, не одна только лиофилизированная композиция по второму аспекту ассоциируется с техническими преимуществами, и не одна только жидкая композиция по первому аспекту ассоциируется с преимуществами: кроме всех

данных преимуществ отдельных композиций, существует преимущество непосредственного превращения упомянутой композиции. Таким образом, в настоящем изобретении преимущества в процессе изготовления соответствующей композиции связаны с преимуществами препарата, получаемого в результате такого процесса.

В одном варианте осуществления по существу безводная композиция может быть получена лиофильной сушкой. Такой препарат может называться лиофилизированным препаратом.

Как показано, например, в примере 2, по существу безводная (например, лиофилизированная) форма выпуска препаратов по настоящему изобретению является стабильной при хранении.

Как описано в настоящей заявке, по существу безводная композиция по настоящему изобретению может быть легко получена из жидкой композиции по настоящему изобретению, например, посредством лиофилизации, как описано в примере 4. По существу безводная композиция является стабильной (смотри пример 5).

Вышеописанные композиции, включающие в себя все вышеперечисленные соединения или по меньшей мере одно из них, обычно можно приготавливать в соответствии с процедурой, подробно изложенной в настоящей заявке, с использованием общеизвестных способов.

По существу безводная композиция по настоящему изобретению ассоциируется с несколькими преимуществами по сравнению с композициями, известными в данной области. Например, Cathflo является известным препаратом tPA для применения в катетерах. Коротко говоря, Cathflo содержит активный ингредиент алтеплазу и вспомогательные вещества аргинин, полисорбат 80 и фосфорную кислоту для регулирования уровня pH. Хотя Cathflo™ позиционируется на рынке как лиофилизированный препарат, лиофилизат должен храниться при температуре холодильного хранения (2-8°C/36-46°F), смотри сравнительный пример 2.

Напротив, по существу безводная композиция в соответствии с настоящим изобретением является стабильной при комнатной температуре. Кроме того, как описано в настоящей заявке, по существу безводная композиция по настоящему изобретению может быть также прямо получена (разделением на аликвоты, при необходимости, и) лиофильной сушкой жидкой композиции по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления по существу безводный препарат обеспечивается в стандартной форме одноразовых лиофилизированных флаконов. В частности, может предусматриваться его восстановление водой, такой как, в особенности, стерильная вода для инъекций (sWFI), подходящая и предназначенная для очищения катетеров.

В общем, хотя существует общая тенденция к тому, что стабильность белковых молекул можно повышать замораживанием при температурах ниже нуля, однако не существует общей тенденции, касающейся влияния заморзания-оттаивания на стабильность белковых молекул: даже структурно относительно близкие белковые молекулы могут значительно различаться по стабильности под действием заморзания-

оттаивания (Rayfield et al., 2017, J. Pharm Sci., vol. 106, p. 1944-1951). Следовательно, конкретная стабильность жидкого препарата по настоящему изобретению под действием замерзания-оттаивания была непредсказуемой, исходя из знаний среднего специалиста в данной области. Невозможно было также спрогнозировать, что такой лиофилизированный препарат будет стабильным при комнатной температуре.

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТА

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, имеющего катетер с нарушенной функциональностью, при этом способ отличается тем, что жидкий препарат по первому аспекту настоящего изобретения вводится по каплям в закупоренный катетер пациента. При использовании по тексту настоящей заявки, термины «лечение» и «проведение лечения» включают в себя, если контекстом не предусмотрено иное, как профилактическое лечение, так и терапевтическое, т.е. имеющее целью излечение, лечение субъекта.

Композицию предпочтительно непосредственно вводят по каплям в катетер пациента. Таким образом, в третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, описанному в настоящей заявке. Для такой цели, по существу безводный препарат по изобретению можно восстанавливать водой. В качестве альтернативы можно использовать жидкую композицию по настоящему изобретению.

В данном способе препарат tPA пригоден для применения в катетере.

Предпочтительные категории катетеров для практического использования упомянутого способа являются катетерами и, предпочтительнее всего, являются закупоренными или частично закупоренными катетерами. Введение препарата по настоящему изобретению имеет целью растворение закупориваний или частичных закупориваний в катетерах. Для данной цели, препарат вводят по каплям прямо в катетер.

Устройства центрального венозного доступа (УЦВД) являются одной категорией катетеров. УЦВД являются наиболее предпочтительными типами катетеров в способах по настоящему изобретению. Коротко говоря, изобретение предполагает также способ лечения пациента, при нарушении функциональности его устройства центрального венозного доступа (УЦВД), заключающийся в том, что пациенту вводят жидкую композицию по настоящему изобретению.

Без намерения быть связанными какой-либо конкретной теорией, предполагается, что tPA направлено действует на фибрин (который вызывает свертывание крови), растворяя тромб (кровяной сгусток) и восстанавливая функционирование устройства центрального венозного доступа (УЦВД). Таким образом, катетер предпочтительно является устройством центрального венозного доступа (УЦВД), и композицию непосредственно вводят по каплям в УЦВД. В предпочтительном варианте упомянутый способ пригоден для восстановления функциональности устройства центрального венозного доступа (УЦВД) пациента.

Для целей упомянутого способа, композиция по настоящему изобретению предпочтительно выпускается в одноразовых флаконах. Для этого, одноразовый флакон

предпочтительно содержит по существу безводную композицию по второму аспекту, которую восстанавливают перед введением, посредством чего получают жидкую композицию по первому аспекту.

В настоящей заявке предлагаются два основных альтернативных режима введения:

- В первом варианте осуществления введение является однократным введением.
- Во втором варианте осуществления упомянутое введение является двукратным введением. То есть, после первого (однократного) введения, введение повторяют еще раз через интервал около 60-120 минут, предпочтительно около 90 минут.

Таким образом, tPA показан для восстановления функционирования УЦВД. Восстановление функционирования УЦВД оценивают предпочтительно по возможности взятия крови. Еще предпочтительнее, восстановление функциональности УЦВД измеряют как возможность взять 3 мл крови и/или влить 5 мл солевого раствора.

Восстановленный tPA по настоящему изобретению предпочтительно вводят по каплям в катетер. Тем самым системное действие tPA ограничивается, так как он по существу остается в катетере и воздействует непосредственно на сгусток. Даже при том, что малая доля может попасть в кровоток, не приходится ожидать, чтобы уровни в циркулирующей плазме достигали фармакологических концентраций.

Препарат, пригодный для такого способа, предпочтительно имеет по существу несниженную фибринолитическую активность. Таким образом, независимо от того, подвергался ли или не подвергался препарат замораживанию-оттаиванию перед введением пациенту, пациенту вводят активный ингредиент с по существу несниженной фибринолитической активностью. Данное преимущество может достигаться, в частности, с использованием лиофилизированного препарата по настоящему изобретению, так как такой препарат стабилен в по существу безводной (лиофилизированной) форме при комнатной температуре.

Иначе говоря, в третьем аспекте изобретение относится также к tPA для применения в способе лечения пациента, описанном в настоящей заявке, например, лечения пациента, имеющего катетер с нарушенной функциональностью, например, устройство центрального венозного доступа (УЦВД), при этом способ заключается в том, что пациенту вводят жидкую композицию по настоящему изобретению. Для такой цели, по существу безводный препарат по настоящему изобретению можно восстанавливать водой.

СПОСОБЫ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ КОМПОЗИЦИЙ

В пятом аспекте настоящее изобретение относится также к способу получения композиции по первому аспекту, при этом способ по существу состоит в добавлении воды в композицию по второму аспекту. В общем, предпочтительно, чтобы вода была водой высокой степени чистоты, предпочтительнее водой для инъекций (WFI). В частности, предпочтительна стерильная вода для инъекций (sWFI). В предпочтительном варианте такой способ применим в связи с одноразовыми флаконами, описанными в настоящей заявке. Это допускает транспортировку стабильной при хранении композиции по второму

аспекту к месту использования и превращение по существу безводной композиции в жидкую композицию на упомянутом месте использования. Без ограничения, типичное место использования является центром инфузии. Типичные центры инфузии включают в себя клиники и больницы. Использование на упомянутом месте обычно состоит во введении пациенту, как описано в настоящей заявке.

В шестом аспекте настоящее изобретение относится также к способу получения по существу безводной композиции по второму аспекту, при этом способ по существу заключается в том, что обезвоживают композицию по первому аспекту. В частности, подходящие варианты осуществления описаны ниже в примерах, однако примеры нельзя толковать как ограничивающие.

Композиции можно преобразовывать, как показано в следующей таблице 1.

Таблица 1: Схематический обзор композиций в соответствии с настоящим изобретением.

Композиция	Преимущество(а) (неограничивающие; подробности смотри по тексту)
Готовая нерасфасованная лекарственная субстанция (FBDS)	Стабильность при замерзании-оттаивании Изменения состава (изменения композиции) не требуется; может быть непосредственно разделена на аликвоты
↓ аликвотирование, лиофилизация	
По существу безводная композиция (например, сухая порошковая масса)	Стабильность при комнатной температуре; Восстановление обеспечит композицию для использования в катетере
↓ восстановление (предварительно заданным количеством воды)	
Готовое к использованию лекарственное средство (для введения в катетер)	Готовность к использованию

Изготовление лекарственного средства содержит этапы оттаивания замороженной жидкой лекарственной субстанции, затем его лиофилизации для получения по существу безводной композиции. По существу безводная композиция является предпочтительно сухой порошковой массой во флаконах (лиофилизатом). Жидкий препарат перед

лиофилизацией обозначается как нерасфасованная лекарственная субстанция или BDS для краткости.

Лекарственное средство превращают в лиофилизированную форму, чтобы сделать его характеристики стабильными при комнатной температуре.

НАБОР

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится также к набору, содержащему по существу безводную композицию по первому аспекту, а также воду для восстановления. В частности, настоящее изобретение относится к набору, описанному в настоящей заявке. Для этого композицию можно выпускать серийно в наборе (флакон с лекарством, совместно упакованным с водой).

Коротко говоря, такой набор может содержать по существу безводный препарат по настоящему изобретению, а также соответствующее количество воды для инъекций (WFI). Препарат и WFI могут быть совместно упакованы, при необходимости, но предпочтительно вместе с инструкциями по применению.

Однако в некоторых вариантах осуществления предпочтительно не производить композицию серийно в наборе (флакон с лекарством, совместно упакованный с водой). В таком случае, только флакон с лекарством промышленно упаковывают в коробке вместе с инструкцией по применению препарата/проспектом.

Нижеприведенные примеры и сравнительные примеры поясняют изобретение, без ограничения его объема.

ПРИМЕРЫ

Сравнительный пример 1: Активаз (лиофилизированный порошок алтеплазы)

Алтеплаза является рекомбинантным tPA. Конкретнее, алтеплаза является очищенным tPA, гликопротеином, состоящим из 527 аминокислот. Алтеплазу получают с использованием комплементарной кодирующей цепи ДНК (кДНК) для природного тканевого активатора пламиногена (tPA), полученного из линии клеток человека. Производственный процесс предусматривает секрецию фермента алтеплазы в питательную среду устойчивой линией клеток млекопитающих (яичника китайского хомячка, СНО), в которую была вставлена кДНК гена алтеплазы.

Активаз является лиофилизированным препаратом, содержащим алтеплазу в аргинин-содержащем фосфатном буфере с приблизительно 0,01% полисорбата 80. Поставляется в форме стерильного лиофилизированного порошка. Алтеплаза, при приготовлении в форме лиофилизированного порошка активазы, не проявляет значительной потери биоактивности или молекулярных изменений после хранения в течение более чем 4 лет при контролируемой комнатной температуре. Считается, что стабильности активазы при комнатной температуре способствуют как вспомогательные вещества, так и уровень pH. Однако лиофилизированная активаз претерпевала деградацию после длительной выдержки при высоких температурах, при этом основным путем деградации в твердом состоянии было формирование высокомолекулярных

соединений (Nguyen et al., 1993, in *Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs: Case Histories*, Plenum Press, New York).

В жидком состоянии алтеплаза подвержена также расщеплению протеазой, предположительно алтеплаза сама по себе. (Nguyen et al., там же). В связи с нестабильностью в жидком состоянии, активазы представлена на рынке не в жидком состоянии, но в форме лиофилизированного порошка для восстановления перед использованием.

Вообще говоря, лиофилизированный порошок активазы обычно считается стабильным при комнатной температуре (Nguyen et al., там же).

Сравнительный пример 2: препарат Cathflo (лиофилизированный порошок алтеплазы холодильного хранения)

Препарат Cathflo™ Activase® (Genentech, Inc., South San Francisco, CA), впервые одобренный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США, (FDA) в 2005 г., является лиофилизированным порошком, содержащим алтеплазу (смотри сравнительный пример 1), предназначенным для растворения для инъекции и инфузии.

В соответствии с информацией, представленной FDA (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/103172s5260lbl.pdf), 1 флакон порошка Активазы® Cathflo™ содержит 2,2 мг алтеплазы (что включает в себя 10% избыток), 77 мг L-аргинина, 0,2 мг полисорбата 80 и фосфорную кислоту для регулирования уровня pH. Леофилизированный порошок Активазы® Cathflo™ следует хранить при температуре холодильного хранения (2-8°C/36-46°F). Порошок Активазы® Cathflo™ представляет собой стерильный лиофилизированный порошок от белого до соломенно-желтого цвета. (Lindemann et al., там же).

Препарат Активазы® Cathflo™ следует восстанавливать непосредственно перед использованием и доводить до окончательной концентрации 1 мг/мл (Lindemann et al., 2004, Clin. J. Oncol., Nurs., vol. 8, p. 417-419). Каждый восстановленный флакон будет обеспечивать 2 мг активазы Cathflo, при уровне pH около 7,3.

Сравнительный пример 3: Ретаваза® (лиофилизированный порошок ретеплазы)

Ретаваза® является продуктом, предлагаемым на рынке компанией Chiesi USA, Inc. (Caru, NC), и содержит ретеплазу в качестве активного фармацевтического ингредиента. Ретеплаза является делеционным мутантом tPA, в котором были удалены некоторые участки молекулы tPA дикого типа (Ross, 1999, Clin. Cardiol., vol. 22, p. 165-171).

Пример 1: предварительное рассмотрение девяти разных препаратов

На основании теоретической оценки известного препарата на основе ретеплазы в качестве активного фармацевтического ингредиента (приготовленного по рецептуре в сравнительном примере 3), подходящие условия (изменения уровня pH и содержания компонентов транексамовой кислоты (ТА), фосфата и сахарозы (совместно: TAPS)) были подобраны и тестированы в отношении их значения для стабилизации активного

фармацевтического ингредиента (АФИ).

Активный ингредиент получали в виде раствора АФИ в форме ретеплазы от компании Wacker, Germany.

Конкретно тестировали следующее:

- определение тестовых матриц планирования эксперимента (DoE) из 9 вариантов препарата в общем
- приготовление (диализом) и анализ всех вариантов тестовых матриц
- определение коллоидальной стабильности (межмолекулярного взаимодействия, A2) методом многоугольного рассеяния света в градиенте состава (CG-MALS)

Оценивали также термодинамическую стабильность вариантов методом дифференциальной сканирующей нанокалориметрии (наноDSC) для определения температуры начала денатурации (Tonset).

Разработана следующая матрица из 9 вариантов препарата (таблица E1). Оценивали общее поведение АФИ в отношении уровня pH, концентраций транексамовой кислоты (ТА) и концентрации сахарозы. Образцы приготавливали диализом АФИ в буфер для приготовления соответствующего препарата.

Уровень pH корректировали от 6,0 до 7,5. При каждом уровне pH тестировали две концентрации транексамовой кислоты (1 mM и 10 mM) и две концентрации сахарозы (2% и 8%). В девятом варианте выбрали среднее значение уровня pH 6,75, 5 mM транексамовой кислоты и 5% сахарозы. Концентрацию буфера (калийно-фосфатного) поддерживали на постоянном уровне 50 mM.

Таблица E1: Варианты препарата №№ 1-9

Образец		ТА [mM]	Сахароза (по массе)	Уровень pH	c* [мг/мл]
№ 1		1	2%	6,0	1,52
№ 2		1	2%	7,5	3,33
№ 3		10	2%	6,0	1,52
№ 4		10	2%	7,5	3,33
№ 5		1	8%	6,0	2,98
№ 6		1	8%	7,5	4,41
№ 7		10	8%	6,0	2,98
№ 8		10	8%	7,5	4,41
№ 9		5	5%	6,75	3,36

*с означает концентрацию АФИ после диализа. Во всех препаратах наблюдалось разное выпадение осадка, что приводило к снижению концентрации АФИ. CP=среднее значение уровня pH.

Коллоидальную стабильность ретеплазы в вариантах препарата оценивали методом многоугольного рассеяния света в градиенте состава (CG-MALS) для определения второго

вириального коэффициента A_2 . Термодинамическую стабильность ретеплазы в вариантах препарата оценивали методом дифференциальной сканирующей нанокалориметрии (наноDSC) для определения температуры начала денатурации (Tonset).

В процессе диализа выпадение осадка наблюдали во всех вариантах. Образцы центрифугировали и фильтровали перед измерением методом CG-MALS, чтобы избавиться от осадка, так как междумолекулярные силы можно измерять только между растворенными молекулами.

Транексамовая кислота, как выяснилось, благоприятно влияет на термодинамическую стабильность ретеплазы, но никакого воздействия на коллоидальную стабильность не зафиксировано.

Снижение концентрации сахарозы, как выяснилось, снижает температуру начала (Tonset) процесса теплового разворачивания. Наиболее высокие значения Tonset, полезные для термодинамической стабильности, были определены для вариантов №№ 4, 7 и 8.

Уровень pH оказывает лишь второстепенное влияние на термодинамическую стабильность АФИ. Изменение pH в сторону более высоких значений (pH 7,5) четко показало благоприятное влияние на коллоидальную стабильность.

Девять препаратов оценивали методами дифференциальной сканирующей нанокалориметрии (наноDSC), многоугольного рассеяния света в градиенте состава (CG-MALS), т.е. измерения CG-MALS и другими аналитическими методами.

Метод наноDSC специально предназначен для адаптивного и точного определения температуры денатурации и энтальпии денатурации белков и других макромолекул в растворе, чтобы выполнять скрининговые проверки молекулярной стабильности (данные не показаны). Температура начала термической денатурации, т.е. температура начала конформационного перехода с разворачиванием, определена как Tonset, данные по которой показаны ниже в таблице E3.

Взаимодействие между белковыми молекулами в растворе характеризовали по изменениям их характеристики светорассеяния при разных концентрациях методом CG-MALS. По серии измерений светорассеяния вычисляли второй вириальный коэффициент A_2 , который является характеристическим параметром для оценки взаимодействий молекул. Коэффициент A_2 является характерным для макромолекулы и ее раствора и описывает молекулярные взаимодействия между растворенными макромолекулами. Отрицательный коэффициент A_2 показывает аттрактивные взаимодействия между молекулами растворенной субстанции, тогда как положительный коэффициент A_2 характерен для репульсивных взаимодействий между растворенными белковыми молекулами. Метод CG-MALS базируется на серии растворов макромолекул с разными концентрациями, которые непосредственно вводили в проточную кювету детектора многоугольного лазерного светорассеяния. После этапа введения каждой концентрации поток останавливают, чтобы позволить реакции достичь равновесия для стабилизации сигнала и последующего детектирования. Кажущуюся средневесовую молекулярную массу (M_{wapp}) определяют для каждого этапа по градиенту концентрации посредством

анализа данных светорассеяния и концентрации (данные не показаны).

Результаты оценки термодинамической стабильности и коллоидальной стабильности для ретеплазы сведены в следующей таблице (таблица ЕЗ).

Таблица ЕЗ: Результаты оценки термодинамической и коллоидальной стабильности

Образец	ТА [мм]	сахароза (по массе)	Уровень pH	c* [мг/мл]	A2 [10^{-4} мол×мл/г ²]	Tonset [°C]	примечание
№ 1	1	2%	6,0	1,52	-.**	62	осадок
№ 2	1	2%	7,5	3,33	-3,5	59	осадок
№ 3	10	2%	6,0	1,52	-.**	63	осадок
№ 4	10	2%	7,5	3,33	-4,5	64	осадок
№ 5	1	8%	6,0	2,98	-.**	62	осадок
№ 6	1	8%	7,5	4,41	-2,3	60	осадок
№ 7	10	8%	6,0	2,98	-.**	64	осадок
№ 8	10	8%	7,5	4,41	-2,2	64	осадок
№ 9(СР)	5	5%	6,75	3,36	-4,4	54	осадок

*с означает концентрацию АФИ после диализа, в препаратах №№ 4-12 наблюдалось выпадение осадка, что приводило к снижению концентрации АФИ

**A2 вычислить не удалось, так как нельзя было получить стабильных значений светорассеяния.

Наблюдаемый осадок был белого цвета и аморфным. Большая часть осадка растворялась при добавлении транексамовой кислоты. Остаточный осадок (варианты № 1, № 2, № 3 и № 5) удаляли центрифугированием и последующей фильтрацией с использованием 0,1-мкм шприцевого фильтра.

Из результатов измерений методами CG-MALS и наноDSC (данные не показаны) можно получить следующие общие сведения:

Выпадение осадка АФИ наблюдалось в процессе диализа всех вариантов препарата. Так как концентрация АФИ значительно снижалась после диализа (таблица ЕЗ), то по всей вероятности гРА выпадал в осадок. Данный эффект представлялся более выраженным при уровне pH 6,0, чем при 7,5, исходя из наблюдаемой концентрации АФИ после диализа, которая была выше при уровне pH 7,5 по сравнению с соответствующим вариантом с уровнем pH 6,0.

Однако осадок не должен составлять проблему в следующих примерах, поскольку целевая концентрация гРА является сниженной при 0,36 мг/мл.

Для вариантов с уровнем pH 6,0 данные CG-MALS не удалось интерпретировать.

Выводы по примеру 1 и вышеприведенным примерам

Все тестированные варианты показывали аттрактивное межмолекулярное взаимодействие независимо от концентрации ТА. Видимо только повышенные уровни сахарозы оказывали немного благоприятное влияние.

Термодинамическую стабильность повышали увеличением концентрации транексамовой кислоты. Температура начала теплового перехода повышается с приблизительно 60°C при 1 мМ ТА (например, варианты №№ 6-2) до приблизительно 64°C при 10 мМ ТА (например, варианты №№ 4-8).

Уровень pH оказывал незначительное влияние на термодинамическую стабильность АФИ.

Хотя термодинамическая стабильность была немного выше при концентрации 10 мМ ТА, коллоидальная стабильность для обеих измеренных концентраций является сравнимой для вариантов с 8% сахарозы при уровне pH 7,5.

Так как температура 60°C далеко не соответствует характерным условиям работы, вариант № 6 можно дополнительно тестировать и рассматривать как вариант для разработки. Иначе говоря, не ожидается, что небольшое преимущество 10 мМ транексамовой кислоты при 60°C по сравнению с 1 мМ транексамовой кислоты немедленно повлияет на стабильность препаратов в условиях работы с ними в больнице. В результате, подходящим считается диапазон, содержащий 1-10 мМ транексамовой кислоты.

Поскольку концентрации сахарозы выше 5% приводят к пролонгации времени сушки во время лиофилизации, то в последующих примерах оценивают фактическую концентрацию сахарозы (в сущности, крио- и лиопротектора) для стабилизации ретеплазы.

Из первоначальных 9 разных препаратов примера 1, препарат, ближайший к препарату, заявленному в настоящей заявке, является прототипом № 2 примера 1. Основное отличие состоит в том, что прототип № 2 содержит 2% сахарозы по массе, тогда как препарат, заявленный в настоящей заявке, содержит оптимально 3% сахарозы по массе.

Пример 2: Сравнение разных концентраций сахарозы: Исследование принудительной деградации путем воздействия на 2 лучших варианта препарата с использованием 3 стрессовых условий

Исходя из данных примера 1, оценивающих 9 разных препаратов, 3 препарата были включены в последующий пример 2 воздействия на них условиями принудительной деградации. 3 препарата различаются по количеству сахарозы (3%, 5%, 8%).

Варианты препарата (таблица E2-1) готовили диализом против буфера для получения соответствующего препарата. Буфер для получения каждого препарата приготавливали индивидуальным навешиванием соответствующих компонентов (без миграции мицелл PS80-PS80 сквозь диализную мембрану, и поэтому PS80 добавляли в раствор лекарственной субстанции после диализа) в аналитический стакан, растворением в очищенной воде и последующим доведением уровня pH до pH 7,5 с помощью 85%

раствора О-фосфорной кислоты.

3 мл основного раствора АФИ в форме белка ретеплазы ($c=5,1$ мг/мл) доводили до 15 мл соответствующим диализным буфером и переносили в предварительно обработанные (в диализном буфере) диализные кассеты. Заполненные ячейки инкубировали в 660 мл диализного буфера при 2-8°C. Производили три смены буфера (через 2 часа; 2 часа; по истечении ночи). После диализа восстановленный раствор АФИ доводили до целевой концентрации 0,36 мг/мл соответствующим диализным буфером и дополняли 10% маточным раствором PS80 (в диализном буфере) до 0,9% PS80 по массе. Раствор лекарственного средства (DP) подвергали стерильной фильтрации и разливали в стерильные стеклянные инъекционные флаконы 6R (по 2 мл во флакон). Флаконы закупоривали и подвергали воздействию нижеописанных специальных стрессовых условий.

Таким образом, исходя из выводов по примеру 1, использовали следующие (таблица E2-1) варианты, подлежащие тестированию при исследовании принудительной деградации, с 1-мМ концентрацией ТА и уровнем pH 7,5, обеспечивающим максимальную амидолитическую активность во время введения:

Таблица E2-1

Образец	ТА [мМ]	сахароза (по массе)	уровень pH
№ 1	1	3%	7,5 (26 мМ фосфата калия)
№ 2	1	5%	7,5 (26 мМ фосфата калия)
№ 3	1	8%	7,5 (26 мМ фосфата калия)

Цель примера 2 состояла в следующем: Тестировать три (3) наиболее перспективных варианта препарата (таблица E2-1) с целевой концентрацией около 0,36 мг/мл в процессе исследования принудительной деградации.

Варианты препарата ретеплазы следовало анализировать до и после воздействия выбранными стрессовыми условиями с использованием аналитических средств, а также методом репрезентативного анализа ферментативной активности.

Составленные образцы подвергали воздействию следующих стрессовых условий 1)-3), описанных ниже.

1) Принудительный термический стресс и перемешивание: Хранение при 35°C в течение 5 суток и 2 недель, и при 200 об/мин.

2) Воздействие светом: В течение 7,5 ч при 750 Вт/м²/35°C BST (следуя руководству ICH Q1B).

3) Стрессовое воздействие заморзания-оттаивания: Жидкие образцы замораживали от комнатной температуры (20°C) до -50°C при контролируемой скорости замораживания 1°C/мин и нагревали снова до комнатной температуры при контролируемой скорости нагревания (1°C/мин, чтобы моделировать условия замораживания насыпью). Последовательно выполняли три цикла без выдержки какого-либо времени.

До и после каждого контрольного момента времени от каждого стрессового условия брали для анализа два жидких образца каждого варианта. Флаконы визуально анализировали на осадок. Образцы анализировали на мутность посредством нефелометрического измерения мутности (в соответствии с Европейской Фармакопеей, 5.0, 2.2.1), концентрацию по A280 нм, агрегатное состояние методом эксклюзионной ВЭЖХ и химическую деградацию методом ВЭЖХ с обращенной фазой. Дополнительно к аналитической оценке, образцы жидкой лекарственной субстанции (FDS) анализировали на ферментативную активность в рамках заданного анализа амидолитической активности.

Вывод:

Все варианты препарата (таблица E2-1) показали явно выраженную чувствительность гРА к стрессовым условиям, приводящим к химической деградации, это четко наблюдалось при воздействии светом и тепловой нагрузке (данные не показаны). Никакой очевидной связи между стабильностью гРА и уровнем сахарозы препарата не наблюдалось.

Упомянутые недостатки не предполагают стабильности жидкой формы выпуска лекарственного средства (DP). Химическая деградация не наблюдалась для образцов, подвергнутых стрессовому воздействию заморозания-оттаивания, что объясняет пригодность для лиофилизированной формы выпуска лекарственного средства.

Все варианты препарата показали достаточную остаточную ферментативную активность после воздействия стрессовых условий. Определить снижение специфической амидолитической активности не удалось.

Подходящими препаратами для превращения в лиофилизированное лекарственное средство из ретеплазы будут № 1 и № 2, тогда как высокий уровень сахарозы препарата № 3 (8%) может затруднить процесс лиофилизации, не обеспечивая никакого дополнительного благоприятного результата.

Анализ амидолитической активности: В данном примере (гРА) применили с доработкой существующего протокола проведения фотометрического анализа амидолитической активности ретавазы (раствора АФИ в форме ретеплазы). Протокол проведения анализа амидолитической активности базируется на высвобождении 4-нитроанилина из субстрата S-2288 (Chromogenix, № 82085239 по каталогу) в соответствии с амидолитической активностью раствора АФИ в форме ретеплазы в щелочной среде. Амидолитическая активность рассчитывается в ферментных единицах [Е] по увеличению поглощения ($\Delta A/\text{мин}$) на длине волны 405 нм. За время измерения по меньшей мере 2,5 минут, увеличение поглощения (значения $\Delta A/\text{мин}$) из-за активности раствора АФИ в форме ретеплазы изменяется прямо пропорционально (от 0,05 до 0,2). Амидолитическую активность образцов жидкой лекарственной субстанции (FDS) тестировали с использованием данного реализованного теста по определению активности. В соответствии с результатами реализации способа, использовали концентрацию в диапазоне 8-22 мкг/мл, чтобы получить соответствующую динамику наклона функции линейного поглощения, без достижения ограничения по субстрату. Амидолитическая

активность отображалась наклоном. Амидолитическая активность остается по существу неизменной после заморозания-оттаивания (данные не показаны). Все образцы, нагреваемые до повышенной температуры (35°C), проявляли значительный рост амидолитической активности, что возможно происходит из-за отщепления домена Крингла от гРА, с повышением в результате молярной концентрации протеолитических активных фракций: доменов Крингла и протеазы (данные не показаны).

ВЭЖХ с обращенной фазой: Анализ методом ВЭЖХ с обращенной фазой применяется для определения содержания двухцепочечных белков в растворе АФИ в форме ретеплазы. АФИ в форме ретеплазы денатурируется и расщепляется. Данное расщепление разрывает дисульфидные связи в молекуле. В данном процессе двухцепочечные молекулы ретеплазы отщепляются в домены Крингла и протеазы, и в процессе ВЭЖХ домены разделяются на пики доменов Крингла и пики протеазы (основные пики). Целые молекулы ретеплазы не отщепляют никаких доменов Крингла, и данные молекулы хроматографируются только в виде основных пиков (пиков протеазы) при ВЭЖХ. Все варианты показали подверженность молекулы ретеплазы к химической деградации под действием света и термического стресса. Упомянутые недостатки не предполагают стабильности жидкой формы выпуска лекарственного средства (DP). Однако значительных различий между тремя препаратами после заморозания-оттаивания не наблюдалось.

Пример 3: Тепловые свойства и осуществимость лиофилизации.

На основании результатов примера 2 следующие 2 предпочтительных варианта препарата гРА дополнительно оценили в отношении лиофилизированной формы выпуска лекарственного средства (2,0 мл объем заполнения во флаконе 6R):

№ 1: 0,35 мг/мл гРА, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы), уровень pH 7,5

№ 2: 0,35 мг/мл гРА, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 5% (по массе) сахарозы), уровень pH 7,5

Данный пример имеет целью определение тепловых свойств растворов для лиофилизации посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и в дальнейшем по результатам измерений DSC. Оценку выполняли при разных процентных содержаниях сахарозы, чтобы контролировать характер разрушения структуры каждого варианта препарата во время лиофилизации в ходе многоступенчатого сканирования критического давления (CPS) с целью контроля характера разрушения структуры при разных уровнях давления от 50 мкбар (5 Па) до 590 мкбар (59 Па) и температуре полки 0°C.

Перспективные препараты № 1 и № 2 приготовили с соответствующей концентрацией 0,35 мг/мл гРА. Измерения DSC обнаружили два тепловых явления. Для обоих препаратов № 1 и № 2, начало теплового явления второго порядка или температуру Tg стеклования определили как приблизительно равную -33,7°C (соответствующее давление паров: 0,27 мбар (27 Па), данные не показаны). Сканирование критического давления

показало разрушение структуры лиофилизированной массы при давлениях от 50 мкбар (5 Па) до 100 мкбар (10 Па) в обоих вариантах препарата № 1 и № 2. На основании полученных данных, для первой возможной операции лиофилизации было выбрано давление в камере 50 мкбар (5 Па).

Далее оценили осуществимость лиофилизации образцов, и образцы подвергали лиофильной сушке с использованием консервативного опытного цикла лиофилизации. Для этого была выполнена первая возможная операция лиофилизации, которая имела целью демонстрацию в общем того, что намеченный вариант препарата сам по себе пригоден для лиофильной сушки в достаточно безопасных условиях. Перспективные препараты № 1 и № 2 приготовили с соответствующей концентрацией 0,35 мг/мл гРА. Один консервативный опытный цикл лиофилизации выполнили с учетом вышеприведенных полученных данных. Опытный цикл лиофилизации был выполнен успешно.

Леофилизированное лекарственное средство анализировали следующими способами:

- внешний вид, документально подтвержденный макрофотографией
- характер восстановления (в 2 мл очищенной воды)
- остаточное содержание воды с помощью обобщенного способа печи Карла Фишера
- химический анализ восстановленных флаконов: определение концентрации по поглощению на УФ длине волны 280 нм, мутности посредством нефелометрического измерения мутности, агрегатного состояния посредством эксклюзионной ВЭЖХ, химической деградации посредством ВЭЖХ с обращенной фазой.

Для обоих вариантов препарата были получены приемлемые лиофилизаты, что доказывает пригодность выбранных вариантов препарата для лиофилизации. Анализ образцов не выявил различимого признака деградации гРА в процессе лиофилизации.

В заключение, доказано, что оба варианта препарата пригодны для лиофилизации с использованием консервативного цикла лиофилизации. Леофилизаты имели вид цельных леофилизированных масс, которые восстанавливаются спонтанно и полностью за время <10 секунд. Значения мутности находились в приемлемом диапазоне ≤ 5 нефелометрических единиц мутности (NTU). Остаточное содержание воды находилось в пределах обычно приемлемого уровня влажности в леофилизированных биофармацевтических препаратах 1-5% (в соответствии с руководством). В восстановленных образцах не удалось заметить никакой деградации и никакой тенденции к агрегации АФИ. При сравнении с вариантом № 2 (с 5% сахарозы) было доказано, что 3% сахарозы (вариант № 1) также подходит для формирования цельной леофилизированной масса, без каких-либо недостатков. С учетом способности варианта № 1 обеспечить такие же характеристики конечного продукта, при меньшем количестве материала, вариант препарата № 1 с 3% сахарозы (по массе) сочли наиболее подходящим кандидатом для перехода к дальнейшей разработке (например, к этапу WP5, разработке цикла

лиофилизации).

Пример 4: Лиофилизация выбранного препарата

Как описано в предыдущих примерах, из 3 препаратов (пример 2) было выбрано 2 препарата (с 3% и 5% сахарозы), которые исследовали для определения тепловых характеристик, и, наконец, был выбран препарат с 3% сахарозы в качестве препарата для последующего исследования с целью разработки цикла лиофилизации: целью данной разработки было создание эффективного и надежного процесса лиофилизации для выбранного окончательного варианта № 1 препарата, содержащего TAPS, за три цикла усовершенствованной лиофилизации:

№ 1: 0,35 мг/мл гРА, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,09% PS80 (полисорбат 80) (по массе), уровень pH 7,5

Образец приготовили в соответствии с предыдущими примерами.

Надежный и эффективный цикл лиофилизации (оптимизированные параметры процесса замораживания, сублимации и вторичной сушки) для оптимального препарата, выбранного из примера 3, предстояло разработать в составе трех циклов усовершенствованной лиофилизации, базирующихся на результатах примера 3.

Цели разработки цикла лиофилизации включают в себя следующее: разработать цикл, который дает (а) стабильную массу и (б) является аналитически стабильным.

АФИ в форме гРА планировалось диализировать вплоть до получения выбранной системы препарата (№ 1, смотри выше) в подходящем количестве (количество 0,70 мг на один флакон; 0,35 мг/мл; объемное наполнение 2,0 мл в одном флаконе). Для каждого цикла планировалось использовать смешанную серию: для каждого цикла планировалось заполнить и обработать около 30 «активных» образцов и 50 тест-образцов «плацебо». Требовалось составить готовые нерасфасованные растворы (активный и плацебо). Нерасфасованные растворы разливали в промытые и стерилизованные теплом стеклянные флаконы 6R, которые частично закупоривали автоклавированными и высушенными пробками для лиофильной сушки и закладывали в лиофилизатор и лиофилизировали. Флаконы с плацебо необходимо было размещать по соседству с активными образцами. Флаконы с плацебо (наполненные только буфером для получения конечного препарата) размещали около флаконов с активными образцами, чтобы имитировать широкодиапазонный режим (замедленную сушку, ожидаемую для внутренних/огражденных от тепла флаконов, в отличие от флаконов, не огражденных от тепла на периферии лотка).

Температуры внутри флаконов планировалось контролировать с помощью внутрифлаконных микротермопар. Давление в камере планировалось контролировать емкостным датчиком давления и вакуумметром Пирани и записывать путем оперативного сбора данных. Предполагалось собирать и оценивать аналитические технологические данные. Параметры лиофилизации планировалось систематически корректировать и оптимизировать.

Лиофилизированные флаконы следовало закрывать после продувки азотом.

Регулировкой давления управляли с помощью вакуумного и дозировочного клапана (инжекция азота). По окончании вторичной сушки или, соответственно, первичной сушки в одноэтапном цикле, флаконы закрывали при давлении 800 мбар (80 кПа) в атмосфере азота.

Активные образцы подлежали анализу следующими способами:

- внешний вид, документально подтвержденный макрофотографией
- характер восстановления
- остаточное содержание воды с использованием обобщенного способа печи Карла

Фишера

Оставшиеся запасные флаконы планировалось сохранить.

На основе примера 3 и дополнительных предварительных экспериментов (не показанных) был разработан следующий подходящий цикл лиофилизации: Технологические параметры, примененные для одноэтапного цикла лиофилизации, перечислены в таблице Е4-1.

Таблица Е4-1: Технологические параметры цикла лиофилизации

Этап		Температура хранения	Температура ледового конденсатора	Давление [Пирани]	Временн ой шаг	Суммарн ое время
№	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]	[ч:мин]
1	Закладка	25	-	атм	00:10	00:10
2	Вывод на температурный режим замораживания	-50	-	атм	1:15	1:25
3	Замораживание	-50	-	атм	04:00	5:25
4	Корректировка вакуума	-50	-80	0,05	00:30	5:55
5	Вывод на температурный режим первичной сушки	30	-80	0,05	07:00	12:55
6	Первичная сушка	30	-80	0,05	40:00	52:55
7	Продувка и закрывание	5	-	750	00:05	53:00

В данном цикле лиофилизации точка перегиба приходится на приблизительно 18,5

ч общего времени процесса/5,5 ч времени первичной сушки. Результаты измерений термопарами почти не показывают значительного расхождения между положениями флаконов по времени сублимации (термопары 1 и 2 центрального (1) и крайнего (2) флаконов) (данные не показаны). Все флаконы с образцами были целыми, без повреждений стекла.

Полученный лиофилизат растворяли в течение 10-12 секунд водой для инъекций (WFI).

В целом, данный цикл лиофилизации определили как особенно подходящий для получения по существу безводной композиции по настоящему изобретению: в частности, разработанный цикл обеспечивает (а) стабильную массу и (b) является аналитически стабильным. Цикл, выбранный в данном примере, выполняет приведенные требования.

Пример 5: Лيوфилизированный препарат стабилен даже при повышенных температурах и восстановлении

Лиюфилизаты хранили в течение нескольких недель (0 недель, 0нед; 4 недель, 4нед, 8 недель, 8нед; 12 недель, 12нед) при разных температурах и анализировали.

Внешний вид лиофилизированных флаконов регистрировали методом макрофотографии. Все лиофилизаты представляли собой цельные лиофилизированные массы без значительных дефектов.

Концентрация: Концентрацию гРА вычисляли по закону Бугера-Ламберта-Бэра с использованием коэффициента экстинкции 1,69 мл/(мг·см). По два флакона для каждого момента времени анализировали в двух параллельных определениях. В результате было установлено, что концентрации сохранялись в течение всего периода хранения в приемлемом диапазоне в соответствии с целевым значением 0,35 мг.

Остаточное содержание воды (титрование по методу Карла Фишера): После лиофилизации образцы для определения остаточного содержания воды готовили путем переноса по одной лиофилизированной массе на каждый образец в титратор Карла Фишера, который немедленно плотно закрывали. Содержание воды в лиофилизированных массах определяли нагреванием образца до 90°C в печи для анализа по Карлу Фишеру и переносом испарившейся воды в кулонометр потоком сухого азота. Два флакона анализировали за одно измерение каждый (одна подготовка образца в каждом случае). Для коррекции на холостое определение применяли пустые флаконы. Результаты остаточного содержания воды собраны в таблице E5-1. Значения остаточной воды в обоих образцах T0 находятся значительно ниже 2%, обычно приемлемого остаточного содержания воды в лиофилизатах. Остаточное влагосодержание ниже 2% для лиофилизированного лекарственного средства обычно считается безопасным (Daukas, L.A., Trappier, E.H., 1998. Assessing the quality of lyophilized parenterals. Pharm. Cosmetic Quality 2, 21-25). Наблюдается небольшое, но несущественное, повышение влагосодержания в моменты времени T8 и T12 недель. Это вероятно обусловлено гигроскопичной влажностью пробок (предположение, основанное на сопоставлении повышения с температурой хранения).

Таблица Е5-1: Остаточное содержание воды в лиофилизатах

Флакон образца	Остаточное содержание воды [%]									
	T0	T4 недели			T8 недель			T12 недель		
		2-8°C	25°C	40°C	2-8°C	25°C	40°C	2-8°C	25°C	40°C
флакон 1	0,73	0,90	0,95	1,20	1,12	1,27	1,32	0,97	1,18	1,22
флакон 2	0,75	0,86	1,02	1,05	0,98	1,34	1,34	1,14	1,10	1,22

По два лиофилизата в моменты времени T0, T4нед, T8нед и T12нед восстанавливали с использованием 2,0 мл очищенной воды. Время восстановления контролировали. Все лиофилизаты в моменты времени T0, T4нед, T8нед и T12нед показали спонтанное и полное растворение лиофилизированных масс в течение 10 секунд.

Нефелометрическая мутность: Мутность измеряли в неразведенных образцах с использованием калиброванного нефелометра после восстановления. В результате определили, что значения мутности были очень низкими для всех образцов. После восстановления лиофилизированных флаконов, не наблюдали визуальной мутности для образцов с выдержкой до моментов времени T0-T12 недель.

Аналитическая оценка лиофилизатов методом ВЭЖХ с обратной фазой после восстановления подтвердила стабильность основного пика в течение периода хранения (данные не показаны).

Агрегатное состояние для каждого момента времени и условия хранения определялось методом эксклюзионной ВЭЖХ и найдено по существу стабильным.

Амидолитическую активность тестировали с использованием примененного теста на активность, описанного в примере 2. Амидолитическая активность отображается наклоном. Результаты анализа активности сведены в таблицу Е5-2.

Таблица Е5-2: Результаты специфического анализа активности образцов. Значения являются средними значениями из девяти измерений каждого образца. Образцы подготавливали разведением Трис-буфером до концентрации гРА 8,75 мкг/мл.

Образец	среднее [кМЕ/мг]; n=9									
	T0	T4 недель			T8 недель			T12 недель		
		2-8°C	25°C	40°C	2-8°C	25°C	40°C	2-8°C	25°C	40°C
Предварительно лиофилизированный образец	459	-	-	-	-	-	-	-	-	-
флакон 1	436	459	481	454	469	465	478	484	479	477
флакон 2	481	482	477	501	470	473	489	481	477	475

Амидолитическая активность была согласованной в ходе исследования для всех образцов.

Пример 6: Обзорное сравнение с коммерческой ретавазой

Одной из целей создания препарата по настоящему изобретению является коммерчески подходящий препарат, который подобен разведенной ретавазе по составляющим, но превосходит по стабильности и другим параметрам. Для этого автор создал новый стабильный препарат, который содержит такие же вспомогательные вещества.

Для облегчения сравнения, в таблице Е6-1 ниже сведены данные по препарату коммерческой формы 081 в сравнении с формой 081 для клинического испытания (разведенная ретаваза) и ретавазой (используемой для ее одобрения на рынке), и в таблице Е6-2 приведены дополнительные препараты по изобретению:

Таблица Е6-1: Сравнение различных TAPS-содержащих препаратов (в объемах по 2 мл)

Внутренний идентификатор:	А	В	С
Препарат	Настоящее изобретение, примерный вариант осуществления	Для клинического испытания (пример 7) (разведенная ретаваза)	Коммерческая ретаваза
Ретеплаза	0,7 мг	0,7 мг	17,4-18,1 мг (масса 5460 мг)
Транексамовая кислота	0,31 мг	0,32 мг	8,00 мг
Сахароза	61 мг	14,0 мг	350 мг
Полисорбат 80	1,9 мг	0,20 мг	5,0 мг
Дифосфат калия	8,36 мг	5,24 мг	131 мг
Фосфорная кислота 85%	0,69 мг	1,97 мг	49,3 мг

Препарат А соответствует 0,09% PS80 (по массе)

Table Е6-2: Другие примеры TAPS-содержащих препаратов

Препарат А2-0,35 мг/мл ретеплазы, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,0675% PS80 (по массе), уровень pH 7,5 (ретеплаза:PS 80 в отношении 0,52:1)

Препарат А3-0,35 мг/мл ретеплазы, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,045% PS80 (по массе), уровень pH 7,5 (ретеплаза:PS 80 в отношении 0,78:1)

Препарат А4-0,35 мг/мл ретеплазы, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,02% PS80 (по массе), уровень pH 7,5 (ретеплаза:PS 80 в отношении 1,75:1)

Препарат А5-0,35 мг/мл ретеплазы, 26 мМ фосфата калия, 1 мМ транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,01% PS80 (по массе), уровень pH 7,5 (ретеплаза:PS 80 в отношении 3,5:1)

Как описано выше, препараты А, А1-А4 по настоящему изобретению разработаны как наиболее стабильные препараты, исходя из первоначально различных 9 прототипов. В частности, относительные количества сахарозы и/или полисорбата 80 существенно отличают препарат по настоящему изобретению от ранее известных разведенных и неразведенных препаратов ретавазы.

Пример 7: Клиническое испытание на субъектах с вышедшими из строя устройствами центрального венозного доступа (УЦВД), не предназначенными для гемодиализа

На стадии III планируется многонациональное мультицентровое рандомизированное и двойное слепое исследование в параллельных группах с активным и плацебо-контролем, чтобы испытать введение TAPS-забуференного препарата ретеплазы, содержащего 0,7 миллиграмм (мг) (0,4 единиц) на 2 миллилитра (мл) ретеплазы (разведенной ретавазы), в сравнении с плацебо или алтеплазой, на субъектах с вышедшими из строя устройствами центрального венозного доступа (УЦВД).

Участники будут получать 1 или 2 дозы препарата В (смотри пример 6), 0,7 миллиграмм (мг) (0,4 единиц) на 2 миллилитров (мл) непосредственно в просвет катетера. Участники будут получать первую дозу в момент времени на минуте (мин) 0 и вторую дозу, при необходимости, в момент времени на мин 90.

В процессе исследования период лечения будет состоять из одного посещения, которое может происходить в один день со скринингом или на следующий день. После удовлетворения всем критериям включения, субъектов случайным образом распределят в отношении 9:1:6 к получению препарата А, А1-А5: плацебо: алтеплаза. Планируется выполнение последующей оценки на 30 день (± 2 дня) после лечения исследуемым лекарством.

Перед приемом на исследование будут выполняться стандартные измерения артериального давления и частоты сердечных сокращений и тестирование мочи на беременность. В ходе всего исследования будут регистрироваться показатели безопасности, включающие в себя нежелательные явления, возникшие в ходе лечения (TEAE), нежелательные реакции на лекарства (ADR) и нежелательные явления особого значения (AESI). Окончанием испытания устанавливается последний контакт последующей оценки последнего пациента, принявшего исследуемое лекарство в ходе испытания.

Клиническое испытание обычно характеризует действия TAPS-забуференного препарата ретеплазы, содержащего 0,7 миллиграмм (мг) (0,4 единиц) на 2 миллилитра (мл).

Препарат по настоящему изобретению (смотри, например, препараты А, А1-А4 в примере 6) превосходит разведенную ретеплазу (препарат В, пример 6) по меньшей мере,

по различным параметрам стабильности, рассмотренным в настоящем изобретении, в том числе, по стабильности при хранении при комнатной температуре и по приготовлению.

Пример 8: Инструкции по применению в клинических условиях

Инструкции по применению в профессиональных условиях могут включать в себя, например, следующие или подобные им инструкции. Ниже представлен наглядный пример.

1. Развести по существу безводную композицию по настоящему изобретению водой для инъекций (WFI) и проверить полученное средство перед введением на присутствие примесей и изменение цвета.

2. Взять 2 мл (2 мг) раствора из разведенного флакона.

3. Закапать надлежащую дозу препарата tPA в закупоренный катетер.

4. Через 30 минут выдержки по времени, оценить функционирование катетера попыткой взять кровь путем аспирации. Если катетер функционирует, то перейти на шаг 7. Если катетер не функционирует, то перейти на шаг 5.

5. Через 90 минут выдержки по времени, оценить функционирование катетера попыткой взять кровь и содержимое катетера путем аспирации. Если катетер функционирует, то перейти на шаг 7. Если катетер не функционирует, то перейти на шаг 6.

6. Если функционирование катетера не восстанавливается после одной дозы препарата по настоящему изобретению, то можно ввести по каплям вторую, количественно равную дозу. Повторить процедуру, начиная с шага 1 приготовления раствора.

7. Если функционирование катетера восстановилось, то взять путем аспирации 4-5 мл крови от пациентов ≥ 10 кг или 3 мл от пациентов < 10 кг, чтобы извлечь препарат tPA.

Пример 9: Разработка двухэтапного цикла лиофилизации

Согласно описанию примера 4 был разработан одноэтапный цикл лиофилизации, допускающий получение лекарственного средства, которое является (а) стабильной массой и (b) является аналитически стабильной. После разработки интенсивного одноэтапного цикла лиофилизации выполнили последующее исследование, чтобы разработать также более традиционный двухэтапный цикл лиофилизации. Как описано в предыдущих примерах, в итоге выбрали препарат с 3% сахарозы в качестве препарата для использования в последующем исследовании по разработке цикла лиофилизации. Целью данной разработки было создание эффективного и надежного двухэтапного процесса лиофилизации для выбранного варианта № 1 конечного препарата, содержащего TAPS, (№ 1: 0,35 мг/мл tPA, 26 mM фосфата калия, 1 mM транексамовой кислоты, 3% (по массе) сахарозы, 0,09% PS80 (полисорбата 80) (по массе), уровень pH 7,5) за четыре цикла усовершенствованной лиофилизации.

Цель разработки цикла лиофилизации включает в себя следующее: разработку цикла, который дает (а) стабильную массу и (b) является аналитически стабильным.

Составили готовые нерасфасованные растворы (активный и плацебо). АПИ в

форме гРА скорректировали до целевого препарата и целевой концентрации (по 0,70 мг во флакон; 0,35 мг/мл; 2,0 мл объем заполнения во флаконе) с соответствующим количеством буфера для регулировки. Нерасфасованные растворы подвергли стерильной фильтрации и разлили в промытые и стерилизованные теплом флаконы 6R, и частично закупорили автоклавированными и высушенными пробками для лиофильной сушки, после чего выполнили лиофильную сушку и лиофилизацию.

Для каждого цикла использовали смешанную серию: около 10 «активных» образцов и 350 тест-образцов «плацебо» наполнили для каждой операции и обработали. Флаконы с плацебо (наполненные только буфером для получения конечного препарата) размещали около флаконов с активными образцами, чтобы имитировать широкодиапазонный режим (замедленную сушку, ожидаемую для внутренних/огражденных от тепла флаконов, в отличие от флаконов, не огражденных от тепла на периферии лотка).

Температуры внутри флаконов контролировали с помощью внутрифлаконных микротермопар. Регулировкой давления управляли с помощью вакуумного и дозирующего клапана (инжекция азота). Давление в камере контролировали емкостным датчиком давления и вакуумметром Пирани и записывали путем оперативного сбора данных. Окончание сублимации определяли по разности емкостного датчика давления и вакуумметра Пирани. Аналитические технологические данные собирали и оценивали. Параметры лиофилизации систематически корректировали и оптимизировали.

Ллиофилизированные флаконы закрывали после продувки азотом. По окончании вторичной сушки, флаконы закрывали при давлении 800 мбар (80 кПа) в атмосфере азота.

Активные образцы анализировали следующими способами:

- внешний вид, документально подтвержденный макрофотографией
- характер восстановления
- остаточное содержание воды с использованием обобщенного способа печи Карла

Фишера

На основе примеров 3 и 4 и на основе дополнительных предварительных экспериментов (не показанных) был разработан следующий подходящий цикл лиофилизации: Технологические параметры, примененные для двухэтапного цикла лиофилизации перечислены в таблице E9.

Таблица E9: Технологические параметры двухэтапного цикла лиофилизации

Этап		Температура хранения	Температура ледового конденсатора	Давление [Пирани]	Временной шаг	Суммарное время
№	Описание	[°C]	[°C]	[мбар]	[ч:мин]	[ч:мин]
1	Закладка	25	-	атм	00:10	00:10
2	Вывод на температурный	-50	-	атм	01:50	2:00

	режим замораживания					
3	Замораживание	-50	-	атм	04:00	6:00
4	Корректировка вакуума	-50	<-65	0,04	00:30	6:30
5	Вывод на температурный режим первичной сушки	-25	<-65	0,04	00:40	7:10
6	Первичная сушка	-25	<-65	0,04	62:00	69:10
7	Вывод на температурный режим вторичной сушки	30	<-65	0,04	01:20	70:30
8	Вторичная сушка	30	<-65	0,04	16:00	86:30
9	Продувка и закрывание	5	-	750	00:05	86:35

В данном цикле лиофилизации точка перегиба приходится на приблизительно 44 ч общего времени процесса/37 ч времени первичной сушки. Лيوфилизация контролировалась емкостным датчиком давления (компании MKS). Все флаконы с образцами были целыми, без повреждений стекла.

Консервативный цикл двухэтапной лиофилизации для препарата А, А1-А5 DP давал в результате бездефектные лиофилизаты с однородными цветом и текстурой. Полученные лиофилизаты растворялись в течение 10 секунд, при использовании очищенной воды. Достигаемое остаточное содержание воды в лиофилизированных образцах было ниже 1%, что значительно ниже приемлемого предела 5% для фармацевтического лиофилизированного лекарственного средства.

В целом, данный цикл лиофилизации определили как особенно подходящий для получения по существу безводной композиции в соответствии с настоящим изобретением: в частности, разработанный цикл обеспечивает (а) стабильную массу и (б) является аналитически стабильным. Цикл, выбранный в данном примере, выполняет приведенные требования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкая композиция содержащая:
 - i. приблизительно 0,15-0,25 единиц (Е)/мл тканевого активатора плазминогена (tPa),
 - ii. приблизительно от 1 мМ до 10 мМ транексамовой кислоты,
 - iii. 2,5-5,0% (по массе) сахарозы; (предпочтительно приблизительно 3,0% (по массе)),
 - iv. при необходимости, неионное поверхностно-активное вещество,
 - v. при необходимости, буферное средство для поддержания уровня pH;
 - vi. при этом препарат имеет уровень pH 6,0-8,0.
2. Композиция по п. 1, в которой тканевой активатор плазминогена (tPA) является ретеплазой.
3. Композиция по п. 2, в которой ретеплаза содержится в количестве 0,2 единиц (Е)/мл.
4. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., в которой tPa присутствует в концентрации приблизительно 0,3-0,4 мг/мл.
5. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., в которой транексамовая кислота присутствует в концентрации приблизительно 1 мМ.
6. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., содержащая неионное поверхностно-активное вещество, при этом неионное поверхностно-активное вещество является полисорбатом 80 (PS80).
7. Жидкая композиция по п. 6, в которой PS80 содержится в количестве от 0,001% (по массе) до 0,1% (по массе).
8. Жидкая композиция по п. 6 или 7, в которой PS80 содержится в количестве, выбранном из группы, состоящей из: 0,01% (по массе), 0,02% (по массе), 0,03% (по массе), 0,04% (по массе), 0,045% (по массе), 0,06% (по массе), 0,0675% (по массе), 0,07% (по массе), 0,08% (по массе) и 0,09% (по массе).
9. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., содержащая буферное средство для поддержания уровня pH, которое является буферной системой фосфата калия и предпочтительно содержит 20-30 мМ фосфата калия, предпочтительнее приблизительно 26 мМ фосфата калия.
10. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., имеющая уровень pH 7,0-8,0, предпочтительно 7,5.
11. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., отличающаяся тем, что композиция содержится в одноразовом флаконе.
12. Жидкая композиция по любому из предыдущих пп., отличающаяся тем, что композиция является стабильной при комнатной температуре в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно по меньшей мере 6 месяцев.
13. По существу безводная композиция, получаемая обезвоживанием композиции по любому из предыдущих пп., предпочтительно посредством лиофилизации.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что композиция имеет форму порошка.

15. Одноразовый флакон, содержащий композицию по п. 13.

16. Одноразовый флакон по п. 15, отличающийся тем, что одноразовый флакон имеет объемную емкость 2-15 мл.

17. Одноразовый флакон по п. 15, отличающийся тем, что одноразовый флакон содержит приблизительно 2 мл упомянутой композиции.

18. Способ лечения пациента, имеющего катетер с нарушенной функциональностью, при этом способ отличается тем, что жидкий препарат по любому из пп. 1-12 вводится по каплям в закупоренный катетер пациента.

19. Способ по п. 18, в котором катетер является устройством центрального венозного доступа (УЦВД), и при этом композиция вводится по каплям прямо в УЦВД.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что способ пригоден для восстановления функциональности устройства центрального венозного доступа (УЦВД) пациента.

21. Способ по п. 18, в котором жидкий препарат обеспечивается в одноразовом флаконе.

22. Способ по п. 18, в котором упомянутое введение по каплям является одноразовым введением.

23. Способ по п. 18, в котором упомянутое введение по каплям повторяют один раз через интервал приблизительно 60-120 минут, предпочтительно приблизительно 90 минут.

24. Набор, содержащий однократную дозу композиции по любому из пп. 13 или 14 и воду для восстановления.

25. Способ восстановления композиции по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что способ по существу состоит в добавлении воды в композицию по п. 13.

26. Применение композиции по любому из пп. 1-12 или композиции по п. 13 для восстановления функциональности катетера.

По доверенности