РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 571 496**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2012149205/15, 20.04.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.04.2011

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
20.04.2010 EP 10160470.0;
20.04.2010 US 61/325,975

(43) Дата публикации заявки: **27.05.2014** Бюл. № **15**

(45) Опубликовано: **20.12.2015** Бюл. № **35**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 00/62759 A1, 26.10.2000. US 2008/0090278 A1, 17.04.2008. MOLLMANN SH., et al., The stability of insulin in solid formulations containing melezitose and starch. Effects of processing and excipients. Drug Dev Ind Pharm. 2006 Jul;32(6):765-78. WO 03/035051 A2, 01.05.2003. RU 2 370 281 C2, 20.10.2009.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **20.11.2012**

(86) Заявка PCT:
EP 2011/056326 (20.04.2011)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/131720 (27.10.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ИВАРССОН Эльза (SE),
ЭСТЕРБЕРГ Йозефин (SE),
РИППНЕР Брита (SE),
НИЛЬССОН Ульрика (SE),
АГЕРКВИСТ Ирене (SE)

(73) Патентообладатель(и):
ОКТАФАРМА АГ (CH)

(54) НОВЫЙ СТАБИЛИЗАТОР ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается способа стабилизации белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа посредством добавления мелицитозы в раствор, содержащий белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, который представляет собой фармацевтически или биологически значимый белок плазмы крови человека или рекомбинантно полученный белок плазмы крови человека, выбранный из группы, состоящей из FIX, FVIII или HES-G-CSF. Группа изобретений также касается применения мелицитозы для стабилизации белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 КДа, где белок представляет собой фактор VIII, фактор IX или HES-G-CSF. Группа изобретений обеспечивает стабилизацию раствора, содержащего фактор VIII, фактор IX или HES-G-

RU 2571496 C2

RU 2571496 C2

CSF. 3 н. и 23 з.п. ф-лы, 6 пр., 11 табл.

RU 2571496 C2

RU 2571496 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 571 496**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012149205/15, 20.04.2011**

(24) Effective date for property rights:
20.04.2011

Priority:
(30) Convention priority:
20.04.2010 EP 10160470.0;
20.04.2010 US 61/325,975

(43) Application published: **27.05.2014** Bull. № **15**

(45) Date of publication: **20.12.2015** Bull. № **35**

(85) Commencement of national phase: **20.11.2012**

(86) PCT application:
EP 2011/056326 (20.04.2011)

(87) PCT publication:
WO 2011/131720 (27.10.2011)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
IVARSSON Ehl'za (SE),
EhSTERBERG Jozefin (SE),
RIPPNER Brita (SE),
NIL'SSON Ul'rika (SE),
AGERKVIST Irene (SE)

(73) Proprietor(s):
OKTAFARMA AG (CH)

RU 2571496 C2

(54) NOVEL STABILISER FOR PHARMACEUTICAL PROTEINS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine and deals with method for stabilisation of protein of human blood plasma with molecular weight higher than 10 kDa by addition of melicitose into solution, which contains protein of human blood plasma with molecular weight higher than 10 kDa, which represents pharmaceutically or biologically important protein of human blood plasma or recombinantly obtained protein of human blood plasma, selected from the group, consisting of FIX, FVIII or HES-G-CSF. Group of inventions also deals with application of melicitose for stabilisation of protein of human blood plasma with molecular weight higher than 10 kDa, where protein represents factor VII, factor IX or HES-G-CSF.

EFFECT: group of inventions provides stabilisation of solution, containing factor VII, factor IX or HES-G-CSF.

26 cl, 6 ex, 11 tbl

RU 2571496 C2

Настоящее изобретение относится к способу стабилизации белка крови человека или белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, к композиции белка крови человека или белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа в твердом или жидком состоянии, а также к использованию мелицитозы для стабилизации белка крови человека или белка плазмы крови человека.

В настоящее время стабилизация фармацевтических белков является большой проблемой для специалистов по составлению составов в фармацевтической промышленности. Существует множество типов воздействий, которые вызывают как обратимые, так и необратимые изменения белков, такие как агрегация, осаждение и денатурация. Эти затруднения вызывают потребность в веществах, стабилизирующих эти чувствительные белки. Разработка составов представляет собой критический этап, требующий осторожного выбора эксципиентов для обеспечения высокого выхода активного белка в процессе очистки, а также при технологическом процессе и в качестве конечного продукта. В частности, это касается белков крови человека и белков плазмы крови человека.

Одним из наиболее широко используемых стабилизаторов для белковых составов являются углеводы, также называемые сахаридами. Углеводы построены из связанных между собой основных углеводных компонентов, называемых моносахаридами, и могут быть разной длины и, таким образом, обладать различными характеристиками. Сахароза и трегалоза - два наиболее часто используемых стабилизатора, представляют собой дисахариды и, следовательно, состоят из двух моносахаридов.

По сравнению с двумя наиболее часто используемыми углеводными стабилизаторами сахарозой и трегалозой, представляющих собой дисахариды, мелицитоза представляет собой трисахарид. В основном, показано [Wang W, Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals, Int. J. Pharm. 203, 1-60, 2000; Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W., Rational design of stable lyophilized protein formulations: Theory and practice, chapter 5, ed Carpenter and Manning, Kluiwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002], что дисахариды представляет собой наилучший выбор для стабилизации белков в растворе и в лиофилизированном состоянии. Некоторые дисахариды, такие как лактоза или мальтоза, являются восстанавливающими сахарами, которые при хранении в твердом состоянии могут разрушать белки посредством реакции Майяра. По литературным данным, при применении в качестве стабилизаторов в лиофилизированных препаратах более крупных сахаров, эти сахара оказываются менее эффективными вследствие пространственного затруднения взаимодействия белок-стабилизатор [Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W., Rational design of stable lyophilized protein formulations: Theory and practice, chapter 5, ed Carpenter and Manning, Kluiwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002].

В обзоре Wang, W., International Journal of Pharmaceutics, 203 (2000) 1-60, "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals", среди прочего, описано, что глюкоза, мальтоза и мальтотриоза могли повышать восстановление каталазной активности при 1 мг•мл$^{-1}$, однако мальтопентоза, мальтогексоза и мальтогептоза не являлись такими эффективными. Неэффективность более крупных сахаридов позволяет предположить, что стабилизация белков сахарами может зависеть от длины глюкозидной боковой цепи сахара, которая может препятствовать образованию межмолекулярных водородных связей между стабилизирующими сахарами и белками. В этой обзорной статье в качестве стабилизаторов рекомендованы дисахариды (стр.9/10).

В WO-A-2003/086443 описано применение стахиозы, мелицитозы, а также различных моно- и дисахаридов при получении препаратов, вводимых интраназально. Сахара

служат в качестве средств, снижающих действие механического раздражения при распылении.

В WO-A-86/04486, среди прочего, описана хроматографическая очистка фактора VIII, где мелицитозу применяют в качестве гидратирующей добавки в процессе хроматографии.

В WO-A-91/18091 описан способ предохранения биологических веществ или органических соединений (a) в сухом состоянии, и/или (b) при повышенных температурах, и/или (c) при облучении, включающий введение в систему, содержащую указанные вещества или соединения сахара или производного сахара, выбранного из (i) невосстанавливающего гликозида полигидроксисоединения, выбранного из сахарных спиртов и других полиспиртов с неразветвленной цепью, или (ii) из невосстанавливающего олигосахарида, выбранного из рафинозы, стахиозы и мелицитозы.

Mollmann, S. H. et al сообщает в Drug Dev. Ind. Pharm. 2006 Jul; (6): 765-78 о стабильности инсулина в твердых лекарственных формах, содержащих мелицитозу и крахмал.

Настоящее изобретение относится к способу стабилизации белка крови человека или белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа посредством добавления в раствор, содержащий белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, мелицитозы.

Предпочтительно молекулярная масса белка крови человека или белка плазмы крови человека составляет более 10 кДа. Более предпочтительно молекулярная масса белка крови человека или белка плазмы крови человека находится в диапазоне от 10 кДа до 300 кДа. Наиболее предпочтительно молекулярная масса белка крови человека или белка плазмы крови человека находится в диапазоне от 20 кДа до 200 кДа. Предпочтительным может являться, чтобы молекулярная масса белка крови человека или белка плазмы крови человека находилась в диапазоне от 50 кДа до 100 кДа или в диапазоне от 100 кДа до 150 кДа, или в диапазоне от 150 кДа до 200 кДа.

В частности, белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа представляет собой фармацевтически или биологически значимый белок. Фармацевтически или биологически значимый белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, который можно стабилизировать по изобретению, может представлять собой рекомбинантно полученный белок крови человека или белок плазмы крови человека.

Термин "белок" включает химически синтезированные белки и синтезированные в природе белки, кодируемые генами культивируемых клеток, а также рекомбинантные белки, секретируемые клетками. Рекомбинантные белки представляют собой белки, кодируемые трансгенами, введенными в клетки способами молекулярной биологии. Белки могут являться модифицированными химическими способами или ферментами в посттрансляционных процессах.

По изобретению "белок" включает белки человека, в частности, белки, продуцируемые клеточными культурами, а также белки из других источников, таких как растения, насекомые и т.д., а также мутантные, искусственные, синтетические, слитые и химерные белки.

Термин "белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа", в частности, включает факторы свертывания крови человека, включая фибриноген, мономер фибрина, протромбин, тромбин, факторы FV, FVa, FX, FXa, FIX, FIXa, FVII, FVIIa, FVIII, FXI, FXIa, FXII, FXIIa, FXIII, FXIIIa, фактор фон

Виллебранда, ADAMTS13 и т.д., транспортные белки, такие как альбумин, трансферрин, церулоплазмин, гаптоглобин, гемоглобин, гемопексин и т.д., ингибиторы протеаз, такие как β-антитромбин, α-антитромбин, α2-макроглобулин, ингибитор C1, ингибитор тканевого фактора (TFPI), кофактор гепарина II, ингибитор белка C (PAI-3), белок C, белок S, белок Z и т.д., иммуноглобулины, такие как поликлональные антитела (IgG), моноклональные антитела, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgA1, IgA2, IgM, IgE, IgD, белок Бенс-Джонса, связанные с клетками белки плазмы крови, такие как тромбоглобулин, фибронектин, тромбоцитарный фактор 4 и т.д., аполипопротеины, такие как apo A-I, apo A-II, apo E, факторы комплемента, такие как фактор B, фактор D, фактор H, фактор I, инактиватор C3b, пропердин, белок, связывающий C4, и т.д., факторы роста, такие как фактор роста тромбоцитов (PDGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста α (TGF-α), трансформирующий фактор роста β (TGF-β), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста гепатоцитов, антиангиогенные белки, такие как латентный антитромбин и прелатентный антитромбин, и т.д., высокогликозилированные белки, включающие кислый гликопротеин альфа-1, антихимотрипсин, интер-альфа-ингибитор трипсина, гликопротеин α-2-HS, C-реактивный белок и другие белки крови человека или белки плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, такие как гликопротеин, богатый гистидином, маннан-связывающий лектин, связывающий C4 белок, фибронектин, GC-глобулин, плазминоген, α-1-микроглобулин, C-реактивный белок, факторы крови, такие как эритропоэтин, интерферон, опухолевые факторы, tPA, gCSF и их производные и мутеины. Особенный интерес представляют фактор IX, фактор VIII, G-CSF, vWF, антитромбин (AT), фактор роста гепатоцитов (HGF), поликлональные IgG, α_1-антитрипсин, фактор H, фактор I, ингибитор C1-эстеразы, фактор VII и их сочетания. Однако такие полипептиды, как инсулин, не охвачены термином "белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа" просто потому, что молекулярная масса инсулина составляет приблизительно 5700 Да.

Термины "белок крови человека" и "белок плазмы крови человека" включают производные, особенно молекулы, модифицированные так, что они имеют большее время полужизни. Модификации с увеличением времени полужизни включают, но не ограничиваются перечисленными, слитые белки, белки, модифицированные посредством мутагенеза, и белки, связанные ковалентной или нековалентной связью с получением конъюгата. По изобретению белки крови человека и белки плазмы крови человека могут быть ковалентно связаны с молекулами гидроксиэтилкрахмала (HES), в частности с получением молекул с молекулярной массой от 20 до 200 кДа.

Когда дают указание молекулярной массы, она относится к молекулярной массе соединений (т.е. включая молекулярную массу любых химических соединений, ковалентно связанных с белком).

В частности, настоящее изобретение относится к способу, где раствор приводят в твердое состояние.

Настоящее изобретение относится к открытию нового стабилизатора для фармацевтического белка крови человека или белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа.

Неожиданно выявлено, что мелицитозу можно использовать в качестве стабилизатора белков крови человека и белков плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, таких как рекомбинантный фактор VIII (170 кДа), фактор IX (55 кДа) и HES-илированный G-CSF (120 кДа). Полагают, что у белков крови человека и белков плазмы крови человека сходной молекулярной массы будут сходные требования к стабилизации.

Например, фактор IX представляет собой зависимый от витамина K белок плазмы крови человека и обладает биохимическим сходством со всеми другими зависимыми от витамина K белками плазмы крови человека. Домен Gla является общим структурным элементом строения во всех этих зависимых от витамина K белках и непосредственно после домена Gla каждый из этих белков (за исключением протромбина) содержит один или более EGF-подобных доменов. Зависимым от витамина K белкам для проявления их физиологической функции необходимы ионы Ca^{2+}, и участки связывания кальция включают по меньшей мере домен Gla и EGF-подобные домены. Связывание кальция позволяет этим белкам связываться с фосфолипидами/клеточными мембранами и, таким образом, проявлять все виды своей биологической активности. Известно, что в своем биосинтезе от витамина K зависят семь белков плазмы крови человека. Они представляют собой протромбин (фактор II, 72 кДа), фактор VII/фактор VIIa (50/50 кДа), фактор IX (55 кДа) или фактор IXa, фактор X (59 кДа) или фактор Xa, белок C (62 кДа), белок S (69 кДа) и белок Z (62 кДа).

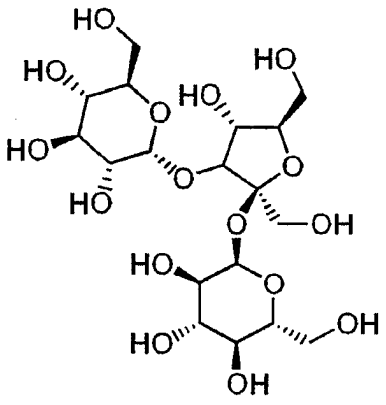
Неожиданно выявлено, что белки крови человека и белки плазмы крови человека, ковалентно связанные с молекулой гидроксилэтилкрахмала (HES), с молекулярной массой в диапазоне 20-200 кДа подходят для стабилизации мелицитозой.

Мелицитоза продемонстрировала превосходную способность поддерживать активность белка в лиофилизированных составах и в растворе.

В соответствии с изобретением, этап приведения раствора в твердое состояние представляет собой лиофилизацию после добавления мелицитозы. Мелицитозу также можно использовать в комбинации с другими сахарами, такими как трегалоза или сахароза. Мелицитоза, которую также записывают как "мелицитоза", представляет собой невосстанавливающий трисахаридный сахар, продуцируемый посредством ферментативной реакции многими насекомыми, питающимися соком растений, включая тлей, таких как Cinara pilicornis. Название по ИЮПАК представляет собой (2R,3R,4S,5S,6R)-2-[[(2S,3S,4R,5R)-4-гидрокси-2,5-бис(гидроксиметил)-3-[[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксилметил)-2-тетрагидропиранил]окси]-2-тетрагидрофуранил]окси]-6-(гидроксилметил)тетрагидропиран-3,4,5-триол.

Молекулярная масса мелицитозы составляет 504,44 г/моль.

Соответствующая структура представлена формулой:



Как правило, мелицитоза содержится в количестве приблизительно до 1000 мМ. Нижний предел зависит от количества мелицитозы, приводящего к достаточному стабилизирующему действию на представляющий интерес белок. Специалист, применяющий методологию из примеров и свои общие знания, может легко определить подходящее количество. Допустимый диапазон представляет собой, например, от 10 мМ до приблизительно 200 мМ или приблизительно от 10 мМ до приблизительно 100

мМ в зависимости от конечного состава. Предпочтительно количество составляет более 20 мМ или более 30 мМ.

Предпочтительно, чтобы количество мелицитозы по отношению к количеству белка крови человека или белка плазмы крови человека находилось в диапазоне от 10: 1 до 5000: 1, предпочтительно в диапазоне от 50: 1 до 150:1 или от 1000:1 до 3000:1, рассчитанное в весовом соотношении, т.е. количество мелицитозы является большим, чем количество белка.

В предпочтительном варианте осуществления в одну фармацевтическую дозу белка включено от 10 до 100 мг мелицитозы.

Задачей настоящего изобретения является создание композиции, содержащей белок крови человека или белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа и мелицитозу. Смесь может находиться в жидком или твердом состоянии.

В одном из вариантов осуществления композиция по изобретению дополнительно содержит наполнитель, поверхностно-активное вещество, буферное средство, дополнительный стабилизатор и/или регулятор тоничности.

Поверхностно-активное вещество по изобретению представляет собой соединение, адсорбируемое на поверхностях и границах раздела фаз и, таким образом, препятствует потере активности белка вследствие адсорбции. Этот тип потери активности может происходить в течение всего процесса обработки фармацевтического средства, а также при манипуляциях с восстановленным продуктом перед введением и при введении пациенту. Широко используемыми поверхностно-активными веществами являются полисорбат 80, полисорбат 20, а также полоксамеры, в частности полоксамер 188. Также в качестве поверхностно-активного вещества можно использовать белки, такие как альбумин, в частности, рекомбинантный альбумин. Также рекомбинантный альбумин можно использовать по варианту осуществления изобретения.

Средством для буферирования pH называют соединение с буферной емкостью в оптимальном для формулируемого белка диапазоне pH. Настоящее изобретение, когда применимо, в качестве средства для буферирования pH включает цитрат натрия, малеиновую кислоту, гистидин, 2-(4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил)этансульфоновую кислоту (HEPES), 3-[N-морфолино]пропансульфоновую кислоту (MOPS), 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), пиперазин-1,4-бис(2-этансульфоновую) кислоту (PIPES) и Tris (трис(гидроксиметил)аминометан). Буферное средство содержится в таком количестве, чтобы поддерживать pH в диапазоне, в котором белок остается функциональным. Это количество различно для разных белков. Специалист знает о диапазонах, предпочтительных для соответствующего белка, в частности, для белка крови человека или белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа. В качестве примера, цитрат натрия поддерживает диапазон pH в пределах от 6,5 до 7,5. Подходящей формой цитрата натрия является форма дигидрата. Как правило, смеси по изобретению могут находиться в лиофилизированной форме, но также могут представлять собой растворы, такие как раствор для лиофилизации и раствор, восстановленный из лиофилизированной композиции.

Регулятором тоничности называют соединение, содержащееся в лекарственной форме для выравнивания тоничности. Настоящее изобретение, при необходимости, включает в качестве регуляторов тоничности хлорид натрия, аргинин, глицин, хлорид калия, сахара и сахарные спирты.

Хотя мелицитоза проявляет крио- и лиопротекторные свойства, также может присутствовать дополнительный крио- и лиопротектор (крио/лиопротектор). Оно представляет собой соединение, содержащееся в лекарственной форме для

дополнительного снижения или предотвращения потери активности белка на этапах заморозки и высушивания в процессе лиофилизации и при последующем хранении лиофилизированного продукта. Настоящее изобретение, при необходимости, включает в качестве дополнительных крио- /лиопротекторов невосстанавливающие дисахариды, такие как сахароза и трегалоза, а также восстанавливающие дисахариды, такие как лактоза и мальтоза.

Наполнителем называют эксципиент, содержащийся в составе для механического поддержания лиофилизированной массы и для увеличения сухой массы. Наполнитель может находиться в кристаллическом состоянии, как хлорид натрия, или в аморфном состоянии, как аргинин. Количество наполнителя может составлять до 10% веса конечного состава. Настоящее изобретение, при необходимости, включает в качестве наполнителей хлорид натрия, глицин, маннитол, сахарозу и аргинин.

Дополнительной задачей настоящего изобретения является использование мелицитозы для длительной стабилизации белка в высушенном состоянии, как, например, в лиофилизированных составах, в течение по меньшей мере 6 месяцев, конкретно - по меньшей мере 12 месяцев, более конкретно - по меньшей мере 18 месяцев, еще более конкретно - 24 месяца.

Далее изобретение описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Анализ активности - фактор VIII

Активность фактора VIII измеряли посредством хромогенного анализа или посредством одностадийного анализа, а единицу фактора VIII выражали в международных единицах (МЕ).

Хромогенный анализ представляет собой способ, предусмотренный в Европейской фармакопее. Способ представляет собой двухэтапный фотометрический способ, которым измеряют биологическую активность фактора VIII как кофактора. Фактор VIII активирует фактор X в фактор Xa, который, в свою очередь, ферментативно расщепляется до продукта, который можно определить спектрофотометрически.

Одноэтапный анализ свертывания основан на способности образца, содержащего фактор VIII, корректировать время свертывания плазмы с дефицитом фактора VIII в присутствии фосфолипида, контактного активатора и ионов кальция. Время появления сгустка фибрина измеряют за один этап.

Анализ активности - фактор IX

Биологическую активность фактора VIII измеряли посредством одноэтапного анализа свертывания и/или посредством хромогенного анализа, а единицу фактора IX выражали в международных единицах (МЕ), как определено текущим стандартом ВОЗ для концентрата фактора IX.

Одноэтапный анализ свертывания представляет собой способ, предусмотренный в Европейской фармакопее. Принцип анализа основан на способности образца, содержащего фактор IX, корректировать время свертывания плазмы с дефицитом фактора IX в присутствии фосфолипида, контактного активатора и ионов кальция. Время появления сгустка фибрина измеряют за один этап. Активность фактора IX обратнопропорциональна времени свертывания.

Хромогенный анализ представляет собой двухэтапный фотометрический метод. На первом этапе фактор IX активируется до фактора IXa активированным фактором XI (XIa) в присутствии тромбина, фосфолипидов и кальция. Фактор IXa образует ферментативный комплекс с активированным тромбином фактором VIII (VIIIa), который в присутствии фосфолипидов и кальция активирует фактор X в фактор Xa. На втором этапе фактор Xa гидролизует специфический для фактора Xa хромогенный субстрат,

высвобождая, таким образом, хромофорную группу pNA, которую можно определить спектрофотометрически. Активность фактора IX прямопропорциональна количеству образующегося фактора Xa.

Анализ - рекомбинантный HES-илированный G-CSF

Анализ HES-G-CSF посредством ВЭЖХ на Resource S

Образцы разбавляют элюентом A до 1 мг/мл. 20 мкг инъецируют в 1 мл колонку Resource S (GE Healthcare, Munich, Germany).

Элюент A:	20 мМ ацетат Na, pH 4,0	
Элюент B:	20 мМ ацетат Na, 0,5 M NaCl, pH 4,0	
Скорость потока:	1 мл/мин	
Градиент:	0%-8% 8%-52% 52%-100%	1,8-2,0 мин 2,0-13,0 мин 13,0-13,6 мин

В качестве критерия качества берут ширину пика HES-G-CSF, так как показано, что у агрегированного HES-G-CSF выявляют наибольшую ширину пика. Приращение ширины пика определяют как разницу ширины пика HES-G-CSF до и после теплового стресса или механического напряжения.

ПРИМЕРЫ

Рекомбинантный фактор VIII

Фактор VIII, используемый в экспериментах, представляет собой рекомбинантный белок фактора VIII человека с удаленным доменом B, продуцируемый в линии клеток человека HEK293F способом, описанным в EP-A-1739179 (Schroder et al.). Способ очистки состоял из пяти этапов хроматографии и позволял получать высокочистый белковый препарат фактора VIII (Winge et al, WO-A-2009/156430) с профилем гликозилирования, сходным с профилем гликозилирования человека (Sandberg et al., PCT/EP2009/060829).

Плазматический фактор IX

Материал, используемый в данных экспериментах, происходит из коммерчески доступного продукта нанотив®, представляющего собой высокочистый, обработанный SD и очищенный посредством нанофильтра концентрат фактора IX. Перед использованием в этих экспериментах материал дополнительно очищали на колонке для гель-фильтрации, где для дальнейших экспериментов использовали пик мономера фактора IX.

Рекомбинантный HES-илированный G-CSF

Используемая клеточная линия представляет собой производное клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK 293), адаптированной к росту без сыворотки. Этого хозяина, HEK293F, стабильно трансфицировали экспрессирующей кассетой, несущей последовательность кДНК, кодирующую последовательность G-CSF. Для кассеты использовали сильный промотор. Общий способ также описан в EP 1739179 (Schroder et al.).

Способ очистки состоял из четырех этапов хроматографии и позволял получать высокочистый белковый препарата G-CSF. Белок G-CSF связывали с производным гидроксиэтилкрахмала (HES) с молекулярной массой приблизительно 100 кДа. В заключение HES-G-CSF очищали от непрореагировавшего производного HES и G-CSF посредством одного этапа хроматографии с получением молекулы с общей молекулярной массой приблизительно 120 кДа.

Пример 1: Стабилизация rFVIII мелицитозой в растворе.

Получение

Рекомбинантный фактор VIII (rFVIII) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенным выше. В эксперименте сравнивали

стабилизирующее действие мелицитозы на rFVIII в растворе с действием обычно используемого стабилизатора трегалозы. Концентрация rFVIII составляла 100 МЕ/мл. Композиции составов, исследуемые в этом эксперименте, представлены в таблице 1.

Таблица 1
Композиции составов

	1A	1B
Мелицитоза, мМ	-	48
Дигидрат трегалозы, мМ	63	-
NaCl, мг/мл	30	30
Дигидрат хлорида кальция, мг/мл	0,5	0,5
Полоксамер 188, мг/мл	2	2
Гистидин, мг/мл	3	3

Для оценки активности белка в зависимости от времени составы хранили до 7 суток при температуре +25°C. Образцы отбирали с регулярными интервалами и анализировали посредством хромогенного анализа, как описано выше в экспериментальном разделе. Результаты кратко изложены в таблице 2 в виде процента от исходного значения.

Таблица 2
Результаты

		Активность фактора VIII в зависимости от времени (сутки), (% от исходного значения)		
		0	1	7
1A	+25°C	100	86	85
1B	+25°C	100	82	86

Выводы из примера 1: Этот эксперимент неожиданно демонстрирует, что мелицитоза, несмотря на ее более низкую молярную концентрацию, обладает стабилизирующим действием на rFVIII в растворе, эквивалентным действию трегалозы.

Пример 2: Стабилизация мелицитозой rFVIII в лиофилизированной форме.

Получение

Рекомбинантный фактор VIII ((rFVIII) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенном выше. В этом эксперименте сравнивали стабилизирующее действие мелицитозы на rFVIII с действием обычно используемого стабилизатора трегалозы в процессе лиофилизации и в лиофилизированных составах. Концентрация rFVIII составляла 100 МЕ/мл. Композиции составов, исследуемые в этом эксперименте, представлены в таблице 3.

Таблица 3
Композиции составов

	2A	2B
Трегалоза, мМ	63	-
Мелицитоза, мМ	-	48
NaCl, мг/мл	30	30
Дигидрат хлорида кальция, мг/мл	0,5	0,5
Полоксамер 188, мг/мл	2	2
Гистидин, мг/мл	3	3

1,5 мл аликвоты растворов лиофилизировали в лабораторных масштабах в лиофильной сушке. Выход белка на этапе лиофилизации составлял 93% для состава 2B и 86% для состава 2A. Для оценки активности белка в зависимости от времени лиофилизированные образцы хранили до четырех недель при +25°C и +40°C. Образцы восстанавливали в 1,5 мл воды для инъекций и анализировали посредством хромогенного анализа, описанного выше в экспериментальном разделе. Результаты кратко изложены в таблице 4.

Таблица 4
Результаты

		Активность фактора VIII в зависимости от времени (недели), (% от исходного значения)			
		0	1	2	4
2A	+25°C	100	97	89	*
	+40°C	100	98	90	93
2B	+25°C	100	117	95	*
	+40°C	100	104	97	99
* без значимого изменения					

Выводы из примера 2: Неожиданно этот эксперимент продемонстрировал, что мелицитоза способна защищать rFVIII на этапе лиофилизации в более низких молярных концентрациях, чем трегалоза, и что при хранении она лучше стабилизирует rFVIII, чем трегалоза.

Пример 3: Стабилизация мелицитозой rFVIII в лиофилизированной форме.

Получение

Рекомбинантный фактор VIII (rFVIII) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенным выше. В этом эксперименте сравнивали стабилизирующее действие мелицитозы на rFVIII с действием обычно используемого стабилизатора трегалозы в процессе лиофилизации и в лиофилизированных составах. Концентрация rFVIII составляла 100 МЕ/мл. Композиции составов, исследуемые в этом эксперименте, представлены в таблице 5.

Таблица 5
Композиции составов

	3A	3B	3C	3D
Мелицитоза, мМ	48	36	24	-
Стахиоза, мМ	-	-	-	30
NaCl, мг/мл	30	30	30	30
Дигидрат хлорида кальция, мг/мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Полоксамер 188, мг/мл	2	2	2	2
Цитрат натрия, мг/мл	2	2	2	2

1,5 мл аликвоты растворов лиофилизировали в лабораторных масштабах в лиофильной сушке. Выход белка на этапе лиофилизации для составов, содержащих мелицитозу, составлял от 91% до 100%, тогда как выход для состава 3D, содержащего в качестве стабилизатора стахиозу, составил 84%. Для оценки активности белка в зависимости от времени лиофилизированные образцы хранили до 12 месяцев при температурах +25°C и +40°C.

Образцы восстанавливали в 1,5 мл воды для инъекций и анализировали посредством хромогенного анализа, описанного выше в экспериментальном разделе. Результаты кратко изложены в таблице 6.

Таблица 6
Результаты

		Активность фактора VIII в зависимости от времени (месяцы), (% от исходного значения)					
		0	1	2	3	6	12
3A							
	25°C	100	*	н.а.	*	*	91
	40°C	100	96	93	93	н.а.	н.а.
3B							
	25°C	100	92	н.а.	96	95	78
	40°C	100	90	79	73	н.а.	н.а.
3C							
	25°C	100	91	н.а.	86	86	67
	40°C	100	70	58	48	н.а.	н.а.

3D							
	25°C	100	95	н.а.	79	65	н.а.
	40°C	100	74	н.а.	51	н.а.	н.а.
н.а. = не анализировали; * без значимого изменения							

Выводы из примера 3: Этот эксперимент демонстрирует, что мелицитоза на этапе лиофилизации и в лиофилизированной форме исключительно хорошо функционирует в качестве стабилизатора для rFVIII. Также он демонстрирует, что стахиоза не является предпочтительным стабилизатором для лиофилизированных составов, так как она по сравнению с составами, содержащими мелицитозу, демонстрирует очень неудовлетворительные результаты при хранении при +25°C и при +40°C.

Пример 4: Стабилизация мелицитозой плазматического фактора IX в лиофилизированной форме.

Получение

Плазматический фактор IX (pFIX) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенным выше. В этом эксперименте исследуют стабилизирующее действие мелицитозы на pFIX. Концентрация pFIX составляла 100 МЕ/мл. Композиция состава, исследуемого в этом эксперименте, приведена в таблице 7.

Таблица 7
Композиция состава

	4A
Мелицитоза, мМ	42
NaCl, мг/мл	30
Полисорбат 80, мг/мл	0,1
Цитрат натрия, мг/мл	2,35

1,5 мл аликвоты растворов лиофилизировали в лабораторных масштабах в лиофильной сушке. Для оценки активности белка в зависимости от времени лиофилизированные образцы хранили до 6 месяцев при +5°C, +25°C и +40°C. Образцы восстанавливали в 1,5 мл воды для инъекций и анализировали посредством хромогенного анализа, описанного выше в экспериментальном разделе.

Результаты

Выход белка на этапе лиофилизации составлял приблизительно 100%. Результаты исследования стабильности приведены в таблице 8.

Таблица 8
Результаты

		Активность фактора IX в зависимости от времени (месяцы), (% от исходного значения)			
		0	1	3	6
4A	5°C	100	88	87	85
	25°C	100	94	89	86
	40°C	100	93	92	н.а.
н.а. = не анализировали; * без значимого изменения					

Выводы из примера 4: Этот эксперимент неожиданно демонстрирует, что мелицитоза хорошо функционирует в качестве стабилизатора фактора IX в лиофилизированной форме.

Пример 5: Стабилизация мелицитозой HES-илированного рекомбинантного G-CSF в лиофилизированной форме.

Получение

Рекомбинантный HES-илированный G-CSF (pHES-G-CSF) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенному выше. В эксперименте

сравнивали стабилизирующее действие мелицитозы на pHES-G-CSF в лиофилизированной форме с действием обычно используемого стабилизатора трегалозы. Концентрация pHES-G-CSF составляла 0,3 мг/мл, а композиции исследованных составов представлены в таблице 9.

Таблица 9
Композиции составов

	5A	5B
Мелицитоза, мМ	70	-
Трегалоза, мМ	-	70
NaCl, мг/мл	30	30
Полисорбат 20, мг/мл	0,2	0,2
Гистидин, мг/мл	3	3

1,5 мл аликвоты растворов лиофилизировали в лабораторных масштабах в лиофильной сушке. Выход белка измеряли через 4 недели хранения при +40°C посредством способа на Resource S, описанного в экспериментальном разделе выше. Результаты кратко изложены в таблице 10.

Таблица 10
Результаты

		Приращение ширины пика (мин) через 4 недели
5A	+40°C	0,04
5B	+40°C	0,06

Выводы из примера 5: Этот эксперимент демонстрирует, что мелицитоза обладает стабилизирующим действием на pHES-G-CSF, лучшим, чем действие обычно используемого стабилизатора трегалозы при равных молярных концентрациях.

Пример 6: Стабилизация плазматического фактора IX мелицитозой на этапе лиофилизации.

Получение

Плазматический фактор IX (pFIX) получали в соответствии с описанием в экспериментальном разделе, приведенным выше. В этом эксперименте исследуют стабилизирующее действие мелицитозы на pFIX на этапе лиофилизации по сравнению с тетрасахаридом стахиозой. Концентрация pFIX составляла 100 МЕ/мл. Композиции исследованных в данном эксперименте составов представлены в таблице 11.

Таблица 11
Композиции составов

	6A	6B
Мелицитоза, мМ	42	-
Стахиоза, мМ	-	30
NaCl, мг/мл	30	30
Полисорбат 80, мг/мл	0,1	0,1
Цитрат натрия, мг/мл	2,35	2,35

1,5 мл аликвоты растворов лиофилизировали в лабораторных масштабах в лиофильной сушке. Образцы анализировали посредством хромогенного анализа, описанного выше в экспериментальном разделе, перед этапом лиофилизации и после этапа лиофилизации.

Результаты

Выход белка на этапе лиофилизации приблизительно составлял 100% для состава 6A, тогда как соответствующий выход для состава 6B составлял 84%.

Выводы из примера 6: Этот эксперимент демонстрирует, что мелицитоза хорошо

функционирует в качестве стабилизатора для фактора IX на этапе лиофилизации. Однако стахиоза не является подходящим кандидатом в стабилизаторы, так как на этапе лиофильной сушки происходит значительная потеря активности.

Формула изобретения

1. Способ стабилизации белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа посредством добавления мелицитозы в раствор, содержащий белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 кДа, который представляет собой фармацевтически или биологически значимый белок плазмы крови человека или рекомбинантно полученный белок плазмы крови человека, выбранный из группы, состоящей из FIX, FVIII или HES-G-CSF.

2. Способ по п. 1, где раствор приводят в твердое состояние.

3. Способ по п. 2, где раствор приводят в твердое состояние посредством лиофилизации.

4. Способ по п. 1, где мелицитоза содержится в количестве до 1000 мМ.

5. Способ по п. 4, где мелицитоза содержится в количестве приблизительно от 10 мМ до приблизительно 200 мМ.

6. Способ по п. 5, где мелицитоза содержится в количестве от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где присутствует по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество, такое как рекомбинантный альбумин, полисорбат 80, полисорбат 20 или полоксамеры.

8. Способ по п. 7, где полоксамер представляет собой полоксамер 188.

9. Способ по любому из пп. 1-6, где присутствует по меньшей мере одно буферное средство, такое как гистидин, цитрат натрия, HEPES, Tris, MOPS или PIPES.

10. Способ по любому из пп. 1-6, где дополнительно присутствует по меньшей мере один стабилизатор, такой как сахара, аминокислоты, полиолы, кофакторы или их сочетания, и/или где присутствует по меньшей мере один регулятор тоничности, такой как хлорид натрия, аргинин, глицин, хлорид калия, сахара или сахарные спирты, и/или где присутствует по меньшей мере один наполнитель, такой как глицин, маннит, хлорид натрия, аргинин или сахароза.

11. Композиция для терапевтических целей, содержащая белок плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 КДа и мелицитозу, где белок представляет собой фактор VIII, фактор IX или HES-G-CSF.

12. Композиция по п. 7 в жидком или твердом состоянии.

13. Композиция по п. 7 или 8, дополнительно содержащая наполнитель, поверхностно-активное вещество, буферное средство, дополнительный стабилизатор и/или регулятор тоничности.

14. Применение мелицитозы для стабилизации белка плазмы крови человека с молекулярной массой более 10 КДа, где белок представляет собой фактор VIII, фактор IX или HES-G-CSF.

15. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой стабилизацию в ходе процесса.

16. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой стабилизацию в процессе лиофилизации.

17. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой стабилизацию в растворе.

18. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой стабилизацию при

очистке.

19. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой стабилизацию при получении в клеточной культуре.

20. Применение по п. 14, где стабилизация представляет собой длительную стабилизацию.

21. Применение по п. 20, где длительная стабилизация увеличивает срок годности.

22. Применение по п. 20, где длительная стабилизация представляет собой стабилизацию в течение по меньшей мере 6 месяцев.

23. Применение по п. 20, где длительная стабилизация представляет собой стабилизацию в течение по меньшей мере 12 месяцев.

24. Применение по п. 20, где длительная стабилизация представляет собой стабилизацию в течение по меньшей мере 18 месяцев.

25. Применение по п. 20, где длительная стабилизация представляет собой стабилизацию в течение 24 месяцев.

26. Применение по п. 20, где длительная стабилизация представляет собой стабилизацию в течение 36 месяцев.