

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 036091

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.09.25

(51) Int. Cl. A61K 38/36 (2006.01)  
A61K 38/48 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201790415

(22) Дата подачи заявки  
2015.08.20

---

(54) ВОДНЫЕ СОСТАВЫ АНТИДОТОВ ФАКТОРА Xa (fXa) ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ  
ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ КРОВОТЕЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) 62/039,809

(56) US-A1-20110015128

(32) 2014.08.20

US-A1-20040180827

(33) US

WO-A1-2011131720

(43) 2017.08.31

US-A1-20130252979

(86) PCT/US2015/046173

WO-A1-200048635

(87) WO 2016/029061 2016.02.25

WO-A1-2011088152

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ПОРТОЛА ФАРМАСЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Вонг Дзуан, Сача Грегори А., Нгуйен  
Фуонг М. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

---

(57) Изобретение относится к водным составам антидотов фактора Xa (fXa) для предупреждения или уменьшения кровотечения и способам их получения, а также к соответствующим лиофилизованным композициям для предупреждения или уменьшения кровотечения и соответствующим способам.

B1

036091

036091  
B1

### Перекрестная ссылка на родственные патентные заявки

Настоящая заявка приоритет согласно 35 U.S.C. 119 (e) предварительной заявки на патент США № 62/039809, поданной 20 августа 2014, которая в полном объеме и во всех смыслах включена в данный документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Антикоагулянты удовлетворяют потребности рынка в лечении или предотвращении нежелательного тромбоза у пациентов со склонностью к тромбообразованию, таких как, например, пациенты с нарушениями свертывания крови, ограниченные периодами неподвижности или проходящие хирургические операции. Однако одним из основных ограничений терапии антикоагулянтами является риск кровотечения, связанный с лечением, и ограничения возможности быстрой остановки антикоагулирующей активности в случае передозировки или в случае необходимости срочного хирургического вмешательства. Следовательно, существует острая необходимость в специфических эффективных антидотах ко всем формам терапии антикоагулянтами.

Доставка биологически активных белков путем инъекции в общем случае является оптимальным путем доставки, когда пероральная доставка непрактична или необходимо незамедлительное действие терапевтического средства. Однако биологические, химические и физические барьеры, такие как плохие сохранность, осмоляльность, растворимость и стабильность, делают проблематичной доставку биологически активных агентов млекопитающим посредством инъекции. Лиофилизация может решить проблему долгосрочного хранения. Однако существуют проблемы, возникающие и в случае лиофилизации, такие как плохие растворимость и стабильность лиофилата. Следовательно, существует необходимость в улучшенных инъецируемых составах антидотов к антикоагулянтам, которые являются стабильными и растворимыми. Данное изобретение удовлетворяет этим и другим потребностям.

Любые и все публикации, патенты, патентные заявки, упоминаемые в данном документе, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

### Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены лиофилизированные составы производного белка фактора Xa (fXa), называемые "г-антидотом". По сравнению с белком fXa дикого типа г-антидот содержит модификации в домене Gla и активном сайте, сохраняет способность fXa связываться с ингибитором fXa, но не образует комплекс протромбиназы. г-антидот представляет собой двухцепочечный полипептид (смотрите SEQ ID NO: 3 в табл. 3), который содержит легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5), соединенные одной дисульфидной связью между цистеином 98 (Cys98) легкой цепи и цистеином 108 (Cys108) тяжелой цепи.

Так же, как и fXa дикого типа, г-антидот претерпевает посттрансляционные модификации, приводящие к гликозилированию в определенных аминокислотных остатках, например, Ser56, Ser72, Ser76 и Thr82 легкой цепи и Thr249 тяжелой цепи, и образованию модифицированного остатка (3R)-3-гидроксиAsp в Asp29 легкой цепи. Более того, кроме межцепочечной дисульфидной связи существуют внутрицепочечные дисульфидные связи, образуемые между цистеинами 16 и 27, 21 и 36, 38 и 47, 55 и 66, 62 и 75 и 77 и 90 легкой цепи и между цистеинами 7 и 12, 27 и 43, 156 и 170 и 181 и 209 тяжелой цепи.

Учитывая двухцепочечную структуру и различные посттрансляционные модификации г-антидота, в данном документе показано, что разработка стабильного лиофилизированного лекарственного состава, который обеспечивает стабильный и растворимый раствор с приемлемой осмоляльностью, является сложной задачей. При этом неожиданно авторы настоящего изобретения смогли найти решение, в котором сбалансированы растворимость белка, стабильность, структура лепешки и осмоляльность.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен водный состав. В одном варианте реализации изобретения состав содержит от 10 мМ до 55 мМ аргинина или от 8 мМ до 35 мМ цитрата, от 1 до 3% сахарозы (мас./об.)/ от 2 до 8% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 5 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, вторую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH от 7,5 до 8.

В некоторых аспектах состав содержит от 40 мМ до 50 мМ аргинина, от 1,5 до 2,5% сахарозы (мас./об.), от 4,5 до 5,5% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 10 мг/мл полипептида. В некоторых аспектах состав содержит от 10 до 30 мМ цитрата, от 1,5 до 2,5% сахарозы (мас./об.), от 4,5 до 5,5% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 10 мг/мл полипептида.

В некоторых аспектах состав содержит от 40 мМ до 50 мМ аргинина, от 1,5 до 2,5% сахарозы (мас./об.), от 4,5 до 5,5% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 18, 19 или 20 мг/мл полипептида. В некоторых аспектах состав содержит от 10 мМ до 30 мМ цитрата, от 1,5% до 2,5% сахарозы (мас./об.), от 4,5% до 5,5% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 10 мг/мл полипептида.

В некоторых аспектах состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 10 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в

позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH около 7,8. В одном аспекте состав дополнительно содержит полисорбат 80 (от 0,01% мас./об. до 0,02% мас./об.) и/или буфер.

В некоторых аспектах состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 20 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, вторую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH около 7,8. В одном аспекте состав дополнительно содержит полисорбат 80 (от 0,01% мас./об. до 0,02% мас./об.) и/или буфер.

В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотный остаток, модифицированный так, чтобы он отличался от природных аминокислот. В некоторых аспектах остаток Asp29 первой цепи модифицирован в (3R)-3-гидроксиAsp в Asp29. В некоторых аспектах полипептид содержит по меньшей мере внутрицепочечную дисульфидную связь в каждой из первой и второй цепей.

Также в одном варианте реализации изобретения предложен способ получения лиофилизированного состава двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, вторую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, включающий лиофилизацию описанного выше водного состава.

В другом варианте реализации изобретения предложена лиофилизированная композиция, полученная путем лиофилизации водного состава согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержащая по меньшей мере 10% (мас./мас.) двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, вторую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, и аргинин:сахарозу:маннит в массовом соотношении в диапазоне (0,6-0,95):(1-3):(2-8) или, в альтернативном варианте, L-аргинин HCl:сахароза:маннит в массовом соотношении в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-8).

В некоторых аспектах лиофилизированная композиция содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19% (мас./мас.) двухцепочечного полипептида. В некоторых аспектах массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит находится в диапазоне (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5).

Также предложена лиофилизированная композиция, содержащая по меньшей мере 10% (мас./мас.) двухцепочечного полипептида, содержащего первую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, вторую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в позиции 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в позиции 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, и цитрат:сахарозу:маннит в массовом соотношении в диапазоне (0,15-0,66):(1-3):(2-8). В некоторых аспектах лиофилизированная композиция содержит по меньшей мере 10, 15, 16, 17, 18 или 19% (мас./мас.) двухцепочечного полипептида. В некоторых аспектах массовое соотношение цитрат:сахароза:маннит находится в диапазоне (0,19-0,57):(1,5-2,5):(4,5-5,5).

В другом варианте реализации настоящего изобретения предложен раствор, полученный путем растворения лиофилизированной композиции согласно изобретению. В некоторых аспектах растворителем является вода или солевой раствор.

В другом варианте реализации изобретения предложен способ уменьшения кровотечения у субъекта, проходящего терапию антикоагулянтами, с помощью ингибитора фактора Xa, включающий введение субъекту эффективного количества раствора согласно изобретению. В некоторых аспектах ингибитор фактора Xa представляет собой апиксабан, ривароксабан или бетриксабан.

Также в одном варианте реализации изобретения предложен водный состав, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3, солубилизирующий агент, стабилизатор и кристаллический компонент, при этом состав не разрушается во время лиофилизации.

В некоторых аспектах кристаллический компонент представляет собой маннит. В некоторых аспектах маннит присутствует в концентрации от 2 до 8% (мас./об.). В некоторых аспектах солубилизирующий агент представляет собой аргинин или цитрат, а стабилизатор представляет собой сахарозу. В некоторых аспектах водный состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество и буфер. В некоторых вариантах реализации изобретения предложена лиофилизированная композиция, полученная путем лиофилизации водного состава.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-F приведены графики, иллюстрирующие растворимость г-антидота в разных условиях (pH, солубилизирующий агент, ионная сила). Окрашенные столбики указывают на то, что наблюдалось осаждение белка, а пустые столбики указывают на то, что осаждения белка не наблюдалось.

На фиг. 2 приведена ДСК-термограмма теплового потока для 10 мМ раствора трис, иллюстрирующая охлаждение при 1°C/мин, и кристаллизационная экзотерма для трис при -32°C.

На фиг. 3 приведена ДСК-термограмма во время охлаждения 10 мМ трис с 95 мМ аргинина. Кристаллизационная экзотерма для трис отсутствует.

На фиг. 4 приведена ДСК-термограмма для раствора, содержащего 10 мМ трис, 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая кристаллизацию маннита приблизительно при -18°C.

На фиг. 5 приведена ДСК-термограмма для раствора, содержащего 10 мМ трис, 95 мМ аргинина, 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая tg' для сахарозы при -42°C. Раствор отжигали в течение 5 ч при -20°C.

На фиг. 6 приведена ДСК-термограмма для раствора 10 мМ трис, 95 мМ аргинина, 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая этап отжига при -20°C в течение 5 ч без каких-либо признаков кристаллизационной экзотермы.

На фиг. 7 приведена ДСК-термограмма для 10 мМ раствора фосфата натрия, иллюстрирующая кристаллизационную экзотерму для фосфата натрия приблизительно при -10°C.

На фиг. 8 приведена нереверсивная ДСК-термограмма теплового потока для 10 мМ фосфата натрия с 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая кристаллизационную экзотерму с началом приблизительно при -33°C.

На фиг. 9 приведена ДСК-термограмма теплового потока для 10 мМ фосфата натрия, 95 мМ аргинина, 2% сахарозы и 2% маннита, демонстрирующая отсутствие тепловых явлений за исключением эндотермы плавления льда.

На фиг. 10 приведена ДСК-термограмма теплового потока для 10 мМ трис, 10 мМ цитрата, 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая кристаллизационную экзотерму с началом, длящимся приблизительно 24 мин при -2 5°C.

На фиг. 11 приведена ДСК-термограмма теплового потока для 10 мМ трис, 20 мМ цитрата, 2% сахарозы и 2% маннита, иллюстрирующая кристаллизационную экзотерму с началом, длящимся приблизительно 30 мин при -25°C.

На фиг. 12 проиллюстрированы УФ-данные по концентрации для составов трис и фосфатного раствора, сохраняемых при 5°C до 2 недель, по сравнению с лиофилизованными составами при T0.

На фиг. 13 проиллюстрированы УФ-данные по концентрации для составов трис и фосфатного раствора, сохраняемых при 25°C до 2 недель, по сравнению с лиофилизованными составами при T0.

На фиг. 14 проиллюстрированы УФ-данные по концентрации для лиофилизованных составов трис и фосфата, сохраняемых при 25°C, по сравнению с составами раствора при T0.

На фиг. 15 приведена ДСК-термограмма для состава 10 мМ трис, 9,5 мМ аргинина, 2% сахарозы, 2% маннита и 0,01% ПС80, иллюстрирующая начало кристаллизации маннита через 70 мин (начало времени отжига) при -22°C.

На фиг. 16 приведена ДСК-термограмма для состава 10 мМ трис, 47,5 мМ аргинина, 2% сахарозы, 2% маннита и 0,01% ПС80, иллюстрирующая начало кристаллизации маннита через 30 мин при -25°C.

На фиг. 17 приведена кристаллизационная экзотерма ДСК для маннита в случае, когда раствор 10 мМ трис, 47,5 мМ аргинина, 2% сахарозы, 2% маннита и 0,01% ПС80 охлаждали при 1°C/мин до -40°C.

На фиг. 18 приведена кристаллизационная экзотерма ДСК для маннита в случае, когда раствор 10 мМ трис, 47,5 мМ аргинина, 2% сахарозы, 5% маннита и 0,01% ПС80 отжигали при -25°C. Начало кристаллизации соответствовало приблизительно 23 мин.

#### Подробное описание изобретения

##### I. Определения.

Все числовые обозначения, например pH, температура, время, концентрация и молекулярная масса, включая диапазоны, являются приближениями, которые варьируются (+) или (-) с инкрементом 0,1 или 10%. Следует понимать, что, хотя это не всегда четко указано, всем числовым обозначениям предшествует термин "около". Также следует понимать, что, хотя это не всегда четко указано, описанные в данном документе реагенты приведены только лишь в качестве примеров, а их эквиваленты известны в данной области техники.

Употребляемая в описании и формуле изобретения форма единственного числа включает множественные отсылки, если иное четко не следует из контекста. Например, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает множество фармацевтически приемлемых носителей, включая их смеси.

Употребляемый в данном документе термин "содержащий" подразумевает, что композиции и способы включают перечисленные элементы, но не исключают остальные. При употреблении для определения композиций и способов выражение "состоящий преимущественно из" должно подразумевать исключение из комбинации для предполагаемого применения других элементов любой существенной значимости. Таким образом, композиция, состоящая преимущественно из определенных в данном документе элементов, не будет исключать наличие следовых примесей, оставшихся после выделения и очистки, и фармацевтически приемлемых носителей, таких как фосфатно-солевой буфер, консерванты и тому подобное. "Состоящий из" должно подразумевать исключение не только следовых элементов других ингредиентов и существенных этапов способа введения композиций согласно изобретению. Варианты реа-

лизации, определяемые каждым из этих переходных терминов, входят в объем данного изобретения.

Термин "белок" и "полипептид" употребляются взаимозаменяющими в самом широком смысле для обозначения соединения из двух или более субъединиц аминокислот, аминокислотных аналогов или пептидомиметиков. Субъединицы могут быть связаны пептидными связями. В другом варианте реализации изобретения субъединицы могут быть связаны другими связями, например, сложноэфирными, эфирными и т.д. Белок или пептид должен содержать по меньшей мере две аминокислоты, при этом на максимальное число аминокислот, которые могут составлять белковую или пептидную последовательность, ограничений не существует. Употребляемый в данном документе термин "аминокислота" относится к любым природным и/или неприродным или синтетическим аминокислотам, включая глицин и D и L оптические изомеры, аминокислотные аналоги и пептидомиметики. Однобуквенные и трехбуквенные обозначения аминокислот природного происхождения приведены ниже.

"Фактор Xa" или "fX" или "белок fXa" представляет собой сериновую протеазу в пути свертывания крови, который образуется из неактивного фактора X (fX, SEQ ID NO: 1, табл. 1). Нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий фактор X ("fX") можно найти в GenBank под номером доступа "NM 000504". После каталитического отщепления первых 52 остатков тяжелой цепи fX активируется до fXa. fXa содержит легкую цепь и тяжелую цепь. Первые 45 аминокислотных остатков (остатки 1-45 в SEQ ID NO: 1) легкой цепи называются доменом Gla, так как он содержит 11 посттрансляционно модифицированных остатков у карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Он также содержит короткую (6 аминокислотных остатков) ароматическую стековую последовательность (остатки 40-45 в SEQ ID NO: 1). Расщепление химотрипсином избирательно удаляет 144 остатков, что приводит к образованию fXa без домена Gla. Каталитический домен сериновой протеазы fXa расположен в C-конце тяжелой цепи. Тяжелая цепь fXa является высокомолекулярной с другими сериновыми протеазами, такими как тромбин, трипсин и активированный протеин C.

"Нативный fXa" или "fXa дикого типа" относится к fXa, в естественных условиях присутствующему в плазме или выделенному в своей исходной, немодифицированной форме, которая обладает биологической активностью, состоящей в активации протромбина и, следовательно, стимулирующей образование сгустка крови. Данный термин включает полипептиды природного происхождения, выделенные из тканевых образцов, а также рекомбинантно полученный fXa. "Активный fXa" относится к fXa, обладающему прокоагулирующей активностью, состоящей в активации протромбина. "Активный fXa" может быть нативным fXa или модифицированным fXa, который сохраняет прокоагулирующую активность.

В контексте данного документа "производные fXa" относятся к модифицированным белкам fXa, которые не конкурируют с fXa в отношении образования комплекса протромбиназы и обладают сниженной или не обладают прокоагулирующей или каталитической активностью, и при этом связывают и/или в значительной степени нейтрализуют антикоагулянты, такие как ингибиторы fXa. "Прокоагулирующая активность" белка fXa или производного fXa в некоторых аспектах относится к ферментативной активности, которой характеризуется активный полипептид fXa дикого типа. Примеры производных fXa приведены в патенте США № 8153590 и публикациях согласно PCT WO2009/042962 и WO2010/056765, и дополнительные приведены в данном документе, например, в виде SEQ ID NO: 2 и 3 и их биологических эквивалентов.

"Ферментативная активность" полипептида fXa или его производных относится к способности полипептида катализировать биохимическую реакцию с субстратом посредством прямого взаимодействия с субстратом.

SEQ ID NO: 2 содержит 3 мутации по сравнению с fXa дикого типа. Первая мутация представляет собой делецию 6-39 аминокислот в Gla домене fX. Вторая мутация представляет собой замену активационной пептидной последовательности 143-194 аминокислот на RKR. Это приводит к образованию линкера RKRRKR (SEQ ID NO: 6), соединяющего легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5). После секреции этот линкер расщепляется, что приводит к образованию двухцепочечного полипептида, SEQ ID NO: 3 (г-антидота). Третья мутация представляет собой мутацию остатка активного сайта S379 на остаток Ala. Эта аминокислотная замена соответствует аминокислоте 296 и 290 в SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно.

Термин "г-антидот" относится к продукту процессинга двухцепочечного полипептида с SEQ ID NO: 2 после расщепления линкера. Он представлен SEQ ID NO: 3. г-антидот раскрыт, например, в US 8153590, содержание которого включено в настоящее изобретение посредством ссылки. г-антидот содержит легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5), соединенные одной дисульфидной связью между цистеином 98 (Cys98) легкой цепи и цистеином 108 (Cys108) тяжелой цепи. Как и fXa дикого типа, в некоторых производственных сериях г-антидот претерпевает посттрансляционные модификации, приводящие к гликозилированию в определенных аминокислотных остатках, например, Ser56, Ser72, Ser76 и Thr82 легкой цепи и Thr249 тяжелой цепи, и образованию модифицированного остатка (3R)-3-гидроксиAsp в Asp29 легкой цепи. Более того, кроме межцепочечной дисульфидной связи могут существовать внутрицепочечные дисульфидные связи, образуемые между цистеинами 16 и 27, 21 и 36, 38 и 47, 55 и 66, 62 и 75 и 77 и 90 легкой цепи и между цистеинами 7 и 12, 27 и 43, 156 и 170 и 181 и 209 тяжелой цепи.

Таблица 1. Полипептидная последовательность неактивного человеческого фактора X (SEQ ID NO: 1)

|  |
|--|
| 1 ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK    |
| 61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN   |
| 121 GKACIPTGPy PCGKQTLERR KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLDF   |
| 181 NQTQPERGDN NLTRIVGGQE CKDGECPWQA LLINNEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ |
| 241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVRLKT PITFRMNAP    |
| 301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFITQ   |
| 361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK  |
| 421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPe VITSSPLK                                     |

Таблица 2. Полипептидная последовательность г антидота до удаления линкера RKRRKR (SEQ ID NO: 6), (SEQ ID NO: 2)

|   |
|---|
| Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)  |
| 1 ANSFL F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK                                       |
| 61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN  |
| 121 GKACIPTGPy PCGKQTLER  |
| Линкер (SEQ ID NO: 6)   |
| RKRRKR  |
| Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)   |
| 181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINNEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ               |
| 241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVRLKT PITFRMNAP   |
| 301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFITQ  |
| 361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK |
| 421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPe VITSSPLK                                    |

Таблица 3. Полипептидная последовательность человеческого фактора Xa с тройной мутацией после удаления линкера RKRRKR (SEQ ID NO: 6), (SEQ ID NO: 3)

|   |
|---|
| Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)  |
| 1 ANSFL F WNKYKDGQDC ETSPCQNQGK                                       |
| 61 CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN  |
| 121 GKACIPTGPy PCGKQTLER  |
| Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)   |
| 181 IVGGQE CKDGECPWQA LLINNEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ               |
| 241 AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVRLKT PITFRMNAP   |
| 301 ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFITQ  |
| 361 NMFCAGYDTK QEDACQGDAG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK |
| 421 WIDRSMKTRG LPKAKSHAPe VITSSPLK                                    |

Также в настоящем изобретении предложено множество биологических эквивалентов г антидота (или их предшественников, представленных SEQ ID NO: 2) или, в альтернативном варианте, полипептидов, имеющих определенную идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 3. В одном аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют структурные характеристики SEQ ID NO: 3, то есть, модифицированный активный сайт и удаленный или модифицированный Gla-домен. В другом аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют функциональные особенности SEQ ID NO: 3, то есть, не конкурируют с fXa в отношении образования комплекса протромбиназы и обладают сниженной или не обладают прокоагулирующей (например, ферментативной или катализитической) активностью.

Термин "активный сайт" относится к части фермента или антитела, в которой происходит химическая реакция. "Модифицированный активный сайт" представляет собой активный сайт, который был структурно модифицирован так, чтобы обеспечить активному сайту повышенную или сниженную химическую реактивность или специфичность. Примеры активных сайтов включают, но не ограничиваются этим, каталитический домен человеческого фактора X, содержащий 235-488 аминокислотных остатков, и каталитический домен человеческого фактора Xa, содержащий 195-448 аминокислотных остатков. Примеры модифицированного активного сайта включают, но не ограничиваются этим, каталитический домен человеческого фактора Xa, содержащий 195-448 аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 1 с по меньшей мере одной аминокислотной заменой в позиции Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, Lys414 или Arg424.

Подразумевается, что "композиция" означает комбинацию активного агента и другого соединения или композиции, инертного (например, выявляемого агента или метки) или активного, такого как адьювант.

Подразумевается, что "фармацевтическая композиция" означает комбинацию активного агента с носителем, инертным или активным, который делает композицию подходящей для диагностического или терапевтического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Термин "лиофилизованный состав" относится к фармацевтическому составу или композиции, содержащему представляющий интерес полипептид, который был лиофилизирован.

Употребляемый в данном документе термин "объемообразующий агент" относится к ингредиенту, который обеспечивает объем лиофилизированного состава. Примеры объемообразующих агентов включают, без ограничений, маннит, трегалозу, лактозу, сахарозу, поливинилпирролидон, сахарозу, глюкозу,

глицин, циклодекстрины, декстран, твердофазные ПЭГ и их производные и смеси. В одном варианте реализации состав согласно настоящему изобретению необязательно содержит объемообразующий агент.

Употребляемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая лепешка" относится к неразрушенному твердофазному лекарственному продукту, остающемуся после лиофилизации, который обладает определенными необходимыми характеристиками, например, фармацевтической приемлемостью, длительной стабильностью, коротким временем восстановления, надлежащим видом и сохранением характеристик исходного раствора после восстановления. Фармацевтически приемлемая лепешка может представлять собой твердый, порошкообразный или гранулированный материал. Фармацевтически приемлемая лепешка также может содержать до пяти процентов воды от массы лепешки.

Употребляемый в данном документе термин "лиофилизация" или сублимационная сушка относится к процессу, в котором воду удаляют из продукта после его замораживания и помещения в условия вакуума, что позволяет льду переходить непосредственно из твердого в газообразное состояние, не проходя жидкую фазу. Процесс состоит из трех отдельных, уникальных и взаимозависимых процессов: замораживание, первичной сушки (сублимации) и вторичной сушки (десорбции). Способы лиофилизации полипептидов, применяемые в этом изобретении, описаны в данном документе и хорошо известны в данной области техники.

Употребляемый в данном документе термин "буфер" обозначает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое стабилизирует pH фармацевтического состава. Подходящие буферы хорошо известны в данной области техники и могут быть найдены в литературе. Фармацевтически приемлемые буферы включают, но не ограничиваются этим, трис-буферы, аргининовые буферы, гистидиновые буферы, цитратные буферы, сукцинатные буферы и фосфатные буферы. Вне зависимости от применяемого буфера pH можно корректировать кислотой или основанием, известными в данной области техники, например, янтарной кислотой, хлористоводородной кислотой, уксусной кислотой, фосфорной кислотой, серной кислотой и лимонной кислотой, сукцинатом, цитратом, трис-основанием, гистидином, гистидином HCl, гидроксидом натрия и гидроксидом калия. Подходящие буферы включают, без ограничений, гистидиновый буфер, 2-морфолиноэтансульфоновую кислоту (МЭС), какодилат, фосфат, ацетат, сукцинат и цитрат. Концентрация буфера может составлять от около 4 mM до около 60 mM или, в альтернативном варианте, от около 4 mM до около 40 mM, или, в альтернативном варианте, от около 5 mM до около 25 mM.

"Криопротекторы" известны в данной области техники и включают, без ограничений, например, сахарозу, трегалозу и глицерин. В общем случае применяют криопротектор, демонстрирующий низкую токсичность в биологических системах.

Употребляемый в данном документе термин "регулятор тоничности" обозначает фармацевтически приемлемые агенты, применяемые для модуляции тоничности состава. Изотоничность в общем случае относится к осмотическому давлению относительно раствора, обычно относительно раствора человеческой сыворотки крови. Состав может быть гипотоничным, изотоничным или гипертоничным. В одном аспекте состав является изотоничным. Изотоничный состав представляет собой жидкость или жидкость, восстановленную из твердой формы, например, из лиофилизированной формы, и означает раствор, имеющий такую же тоничность, что и другой раствор, с которым его сравнивают, такой как физиологический солевой раствор и сыворотка крови. Подходящие регуляторы тоничности включают, но не ограничиваются этим, хлорид натрия, хлорид калия, глицерин и любой компонент из группы аминокислот, Сахаров согласно определению в данном документе, а также их комбинации.

Употребляемый в данном документе термин "поверхностно-активное вещество" относится к фармацевтически приемлемому органическому веществу, имеющему амфипатическую структуру; а именно, он состоит из групп с противоположными характеристиками растворимости, как правило, растворимой в масле углеводной цепи и растворимой в воде ионной группы. В зависимости от заряда поверхностно-активного компонента поверхностно-активные вещества можно классифицировать как анионные, катионные и неионные поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества часто применяют как смачивающие, эмульсифицирующие, солюбилизирующие и диспергирующие агенты для различных фармацевтических композиций и составов биологических материалов. В некоторых вариантах реализации описанных в данном документе фармацевтических составов количество поверхностно-активного вещества описано в виде процентной доли, выраженной в массово/объемных процентах (мас./об. %). Подходящие фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются этим, группу из жирнокислотных сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана (твин), алкиловых эфиров полиоксиэтилена (Вгj), эфиров алкилфенилполиоксиэтилена (тритон-Х), сополимера полиоксиэтилен-полиоксипропилен (полоксамер, пллюроник) или додецилсульфата натрия (ДСН). Жирнокислотные сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана включают полисорбат 20 (продаваемый под торговой маркой Твин 20<sup>TM</sup>) и полисорбат 80 (продаваемый под торговой маркой Твин 80<sup>TM</sup>). Сополимеры полиоксиэтилен-полиоксипропилен включают продаваемые под названиями Плюроник® F68 или Полоксамер 188<sup>TM</sup>. Алкиловые эфиры полиоксиэтилена включают продаваемые под торговой маркой Вгj<sup>TM</sup>. Эфиры алкилфенилполиоксиэтилена включают продаваемые под торговой маркой Тритон-Х.

"Лиопротектор" относится к фармацевтически приемлемому веществу, которое стабилизирует белок во время лиофилизации (процесса быстрого замораживания и сушки в условиях вакуума). Примеры лиопротекторов включают, без ограничений, сахарозу, трегалозу или маннит.

"Антиоксидант" относится к молекуле, способной замедлять или предотвращать окисление других молекул. Окисление представляет собой химическую реакцию переноса электронов от вещества к окисляющему агенту. Продуктами реакций окисления могут стать свободные радикалы, что запускает цепные реакции, которые дестабилизируют белковые лекарственные составы, и в конечном итоге влияет на активность продукта. Антиоксиданты останавливают эти цепные реакции посредством удаления промежуточных продуктов свободных радикалов и ингибируют другие реакции окисления за счет собственно го окисления. В результате антиоксиданты часто являются восстанавливающими агентами, хелатирующими агентами и поглотителями растворенного кислорода, такими как цитрат, ЭДТА, ДТПА, тиолы, аскорбиновая кислота или полифенолы. Неограничивающие примеры антиоксидантов включают аскорбиновую кислоту (АК, Е300), тиосульфат, метионин, токоферолы (Е306), пропилгаллат (ПГ, Е310), третичный бутилгидрохинон (ТБГХ), бутилированный гидроксианизол (БГА, Е320) и бутилированный гидрокситолуол (БГТ, Е321).

"Консервант" представляет собой природное или синтетическое химическое вещество, которое добавляют в продукты, такие как еда, фармацевтические составы, краски, биологические образцы, дерево и т.д., чтобы предотвратить разложение на компоненты вследствие микробного роста или нежелательных химических изменений. Консервирующие добавки можно применять одни или в сочетании с другими способами консервации. Консерванты могут представлять собой противомикробные консерванты, которые ингибируют рост бактерий и грибков, или антиоксиданты, такие как поглотители кислорода, которые ингибируют окисление составляющих компонентов. Традиционные противомикробные консерванты включают бензалконий хлорид, бензойную кислоту, хлоргексидин, глицерин, фенол, сорбат калия, тимеросал, сульфиты (диоксид серы, бисульфит натрия, гидросульфит калия и т.д.) и двунатриевую соль ЭДТА. Другие консерванты включают традиционно применяемые в парентеральных белках, такие как бензиловый спирт, фенол, м-крезол, хлорбутанол или метилпарабен.

Употребляемый в данном документе термин "поверхностно-активное вещество" обозначает соединения, которые снижают поверхностное натяжение (или натяжение на поверхности раздела) между двумя жидкостями или между жидкостью и твердой фазой. Поверхностно-активные вещества могут действовать как детергенты, смачивающие агенты, эмульсификаторы, пенообразующие агенты и диспергирующие агенты.

Примеры поверхностно-активных веществ включают полисорбат 80, жирнокислотные и алкилсульфонаты; хлорид бензетония, например, HY AMINE 1622 от Lonza, Inc. (Fairlawn, N.J.); жирнокислотные сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана, например, серия ТВИН от Uniqema (Wilmington, Del); и природные поверхностно-активные вещества, такие как натриевая таурохолевая кислота, 1-пальмитоил-2-Sn-глицеро-3-фосфохолин, лецитин и другие фосфолипиды. Такие поверхностно-активные вещества, например, минимизируют агрегацию лиофилизованных частиц во время восстановления продукта. Эти поверхностно-активные вещества могут составлять от около 0,001% до около 5% мас./об..

## II. Составы.

В соответствии с предложенным, fXa дикого типа представляет собой двухцепочечный полипептид. Это справедливо и для многих форм антидотов fXa, включая г-антидот (SEQ ID NO: 3), который содержит легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5), соединенные одной дисульфидной связью между цистеином 98 (Cys98) легкой цепи и цистеином 108 (Cys108) тяжелой цепи. Так же, как и fXa дикого типа, экспрессируемый в клетках г-антидот претерпевает посттрансляционные модификации, приводящие к гликозилированию в определенных аминокислотных остатках, например, Ser56, Ser72, Ser76 и Thr82 легкой цепи и Thr249 тяжелой цепи, и образованию модифицированного остатка (3R)-3-гидроксиAsp в Asp29 легкой цепи. Более того, кроме межцепочечной дисульфидной связи могут существовать одна или более внутрицепочечных дисульфидных связей, образуемых между цистеинами 16 и 27, 21 и 36, 38 и 47, 55 и 66, 62 и 75 и 77 и 90 легкой цепи и между цистеинами 7 и 12, 27 и 43, 156 и 170 и 181 и 209 тяжелой цепи.

Учитывая двухцепочечную структуру и различные посттрансляционные модификации антидотов fXa, в данном документе показано, что разработка стабильного лиофилизированного лекарственной состава, который обеспечивает стабильный и растворимый раствор с приемлемой осмоляльностью, является сложной задачей.

При использовании г-антидота в качестве примера, экспериментальные данные показали, что для поддержания приемлемой растворимости г-антидота необходима высокая концентрация солюбилизирующего агента. В частности, исследования растворимости в примере 4 показывают, что как цитрат, так и аргинин существенно повышают растворимость г-антидота. Кроме того, примеры показали, что г-антидот мог оставаться растворимым в растворе, когда концентрация аргинина составляла 95 мМ или по меньшей мере 10 мМ.

Кроме того, во время процесса лиофилизации было определено, что необходимо поддерживать температуру белка ниже определенной температуры разрушения (около -40°C), чтобы получить прием-

лемые лиофилизированные образцы (пример 6). Однако поддержание такой низкой температуры продукта трудновыполнимо практически. Следовательно, данные демонстрируют, что необходим кристаллизующий компонент (например, маннит), чтобы служить каркасом, который может удерживать аморфный белковый материал на месте после сушки сублимацией.

Однако дополнительно было обнаружено, что присутствие высокой концентрации аргинина (например, 95 мМ) предотвращало кристаллизацию маннита (пример 7). В то же время наличие маннита повышает общую концентрацию сахара в составе, что приводит к неприемлемой осмоляльности раствора (пример 7).

Следовательно, разработка подходящей лиофилизированной формы для г-антидота столкнулась с противоречивыми требованиями в отношении концентрации аргинина в качестве солюбилизирующего агента, маннита в качестве кристаллизующего агента и сахарозы в качестве стабилизирующего агента. В лучшем случае это было непредсказуемо, можно ли сбалансировать такие требования, чтобы создать приемлемую лиофилизированную форму.

Однако, на удивление и неожиданно, авторам настоящего изобретения удалось найти решение, в котором сбалансированы растворимость белка, стабильность, структура лепешки и осмоляльность. В частности, для получения подходящей лиофилизированной формы, раствор г-антидота содержит около 45 мМ аргинина (10-55 мМ), около 2% сахарозы (1-3%) и около 5% маннита (2-8%). Кроме того, раствор содержит около 10 мМ трил и 0,01%-0,02% ПС80 вместе с необходимым количеством г-антидота (например, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл или 50 мг/мл) и имеет pH около 7,8.

Кроме того, несмотря на то, что он известен как хороший солюбилизирующий агент для терапевтических белков, было показано, что цитрат обладает антикоагулирующей активностью.

Смотрите, например, Wright et al., Nephrology (Carlton). 2011 May; 16(4):396-402. Следовательно, так как г-антидот предназначен для применения в качестве антидота к антикоагулирующим агентам (ингибиторам FXa), цитрат посчитали неподходящим для применения с г-антидотом. Неожиданно в данном документе было обнаружено, что цитрат в действительности не препятствует активности г-антидота *in vivo*. Было обнаружено, что подходящая концентрация цитрата составляет от около 10 мМ до около 25 мМ в дополнение к около 2% сахарозы (1-3%) и около 5% маннита (2-8%) в растворе, подходящем для лиофилизации.

Соответственно, после лиофилизации раствора он будет образовывать сухую композицию, которая имеет массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-8). Если в растворе используется, например, от 5 мг/мл до 50 мг/мл г-антидота, тогда массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит:г-антидот находится в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-8):(0,5-5).

И наоборот, когда такой лиофилизированный состав растворяют в воде, солевом растворе или другом сходном растворителе, он может обеспечить раствор, содержащий 10-55 мМ аргинина, около 1-3% сахарозы и около 2-8% маннита.

Аналогично, когда раствор, в котором цитрат используется в качестве солюбилизирующего агента, лиофилизируют, он будет образовывать сухую композицию, которая имеет массовое соотношение цитрат:сахароза:маннит в диапазоне (0,15-0,66):(1-3):(2-8). Если в растворе используется, например, от 5 мг/мл до 50 мг/мл г-антидота, тогда массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит:г-антидот находится в диапазоне (0,15-0,66):(1-3):(2-8):(0,5-5). И наоборот, когда такой лиофилизированный состав растворяют в воде, солевом растворе или другом сходном растворителе, он может обеспечить раствор, содержащий около 8-35 мМ цитрата, около 1-3% сахарозы и около 2-8% маннита.

Результаты, наблюдаемые с г-антидотом, легко можно экстраполировать на другие антидоты FXa, которые имеют сходные структуры, включая биологические эквиваленты г-антидота (или их предшественников, представленных SEQ ID NO: 2). В одном аспекте такие биологические эквиваленты имеют по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 3. В одном аспекте такие биологические эквиваленты содержат две пептидные цепи, каждая из которых имеет по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 соответственно. В одном аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют структурные характеристики SEQ ID NO: 3, то есть, модифицированный активный сайт и удаленный или модифицированный Глазомен. В другом аспекте такие биологические эквиваленты сохраняют функциональные особенности SEQ ID NO: 3, то есть, не конкурируют с FXa в отношении образования комплекса протромбиназы и обладают сниженней или не обладают прокоагулирующей (например, ферментативной или катализитической) активностью.

Также подразумевается, что аргинин можно заменить другим солюбилизирующим агентом, маннит можно заменить другим кристаллизующим агентом, а сахарозу можно заменить другим стабилизирующим агентом, приемлемые примеры каждого из которых доступны в данной области техники и приведены в описании настоящего изобретения.

А. Раствор полипептидов, подходящий для лиофилизации.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложен водный состав, подходящий для лиофилизации, содержащий раскрытий в данном документе антидот FXa или его биологические эквиваленты вместе с солюбилизирующим агентом, стабилизирующим агентом (или стабилизатором) и кри-

сталическим агентом. Состав может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество и/или буфер. В некоторых аспектах наличие каждого из этих агентов предотвращает разрушение антидота fXa во время лиофилизации, например, когда температура сублимационной сушки превышает -40°C, -30°C, -20°C, -10°C, 0°C, 5°C, 10°C или 15°C, достигает 20°C или 25°C.

В одном варианте реализации изобретения предложен водный состав, который можно использовать для лиофилизации.

Водный состав содержит полипептид производного fXa, например, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. Кроме полипептида состав дополнительно содержит солюбилизирующий агент, стабилизатор и кристаллический компонент. Такой состав не разрушается во время лиофилизации в необходимых условиях. В одном аспекте необходимое условие соответствует сублимационной сушке при температуре, превышающей -40°C, или, в альтернативном варианте, превышающей -40°C, -30°C, -20°C, -10°C, 0°C, 5°C, 10°C или 15°C. В другом аспекте необходимое условие соответствует сублимационной сушке при температуре ниже 25°C или, в альтернативном варианте, ниже 20°C, 15°C, 10°C или 5°C.

В одном аспекте полипептид производного fXa содержит модификации в Gla-домене и активном сайте, по сравнению с белком fXa дикого типа. В одном аспекте полипептид производного fXa сохраняет способность fXa связываться с ингибитором fXa, но не образует комплекс протромбиназы. В одном аспекте полипептид производного fXa представляет собой двухцепочный полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, который содержит легкую цепь (SEQ ID NO: 4) и тяжелую цепь (SEQ ID NO: 5), соединенные одной дисульфидной связью между цистеином 98 (Cys98) легкой цепи и цистеином 108 (Cys108) тяжелой цепи. В одном аспекте водный состав содержит по меньшей мере 5 мг/мл полипептида. В одном аспекте водный состав содержит по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл полипептида.

В некоторых аспектах кристаллический компонент включен в состав в концентрации, подходящей для образования кристаллической матрицы во время процесса сублимационной сушки. Компонент кристаллической матрицы применяют для предотвращения разрушения, как продемонстрировано в примерах.

"Кристаллический компонент" относится к молекуле, которая образует кристаллическую матрицу в составе, который содержит полипептид, во время процесса сублимационной сушки.

Неограничивающие примеры кристаллических компонентов включают маннит и глицин.

В некоторых аспектах кристаллический компонент представляет собой маннит (например, кристаллический маннит). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет по меньшей мере 1% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет по меньшей мере 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5% или 4% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе не превышает 8% или, в альтернативном варианте, не превышает 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5 или 4% (мас./об.). В одном аспекте концентрация кристаллического компонента в водном составе составляет от около 1% до около 8% или от около 2% до около 6%, или от около 3% до около 5,5%, или от около 4,5% до около 5,5%, или от около 4,6% до около 5,4%, или от около 4,7% до около 5,3%, или от около 4,8% до около 5,2%, или от около 4,9% до около 5,1%, или около 4%, 4,5% или 5% (мас./об.).

В некоторых аспектах в водный состав включен солюбилизирующий агент. Термин "солюбилизирующий агент" относится к солям, ионам, углеводам, комплексообразующим агентам, полимерам и другим соединениям, которые в случае наличия в растворе повышают растворимость другой молекулы (например, активного ингредиента) в растворе. Неограничивающие примеры солюбилизирующих агентов включают аргинин и цитрат. В одном аспекте солюбилизирующий агент представляет собой аргинин. В одном аспекте солюбилизирующий агент представляет собой цитрат.

В данном документе продемонстрировано, что наличие солюбилизирующего агента применяют для поддержания растворимости и стабильности полипептида fXa в составе. В некоторых аспектах концентрация солюбилизирующего агента (например, аргинина) составляет по меньшей мере 10 мМ или, в альтернативном варианте, по меньшей мере 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 36 мМ или 40 мМ. В некоторых аспектах концентрация солюбилизирующего агента (например, аргинина) не превышает 100 мМ, 96 мМ, 90 мМ, 80 мМ, 70 мМ, 60 мМ или 50 мМ. В некоторых аспектах концентрация солюбилизирующего агента (например, аргинина) составляет от около 10 мМ или 20 мМ до около 60 мМ, от около 10 мМ или 20 мМ до около 55 мМ, от около 35 мМ до около 55 мМ, от около 40 мМ до около 50 мМ, от около 41 мМ до около 49 мМ, от около 42 мМ до около 48 мМ, от около 43 мМ до около 47 мМ, от около 44 мМ до около 46 мМ или около 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ. Следует отметить, что употребляемый в данном документе термин аргинин относится к аминокислоте, а также ее солям (например, аргинин HCl). Аргинин имеет молекулярную массу около 174,2 Да, а аргинин HCl (например, L-аргинин HCl) имеет молекулярную массу около 210,7 Да.

В одном варианте реализации изобретения солюбилизирующий агент представляет собой цитрат или его соль. Соль цитрата представляет собой цитрат натрия. В одном аспекте цитрат имеет концентра-

цию от около 1,0 мМ до около 200,0 мМ. В дополнительном аспекте концентрация цитрата составляет около 25 мМ. В другом аспекте концентрация цитрата составляет около 5 мМ, 10 мМ или 20 мМ. В другом варианте реализации изобретения концентрация цитрата составляет около 0,05 М до около 0,2 М.

В некоторых аспектах в водный состав содержит стабилизатор. Термин "стабилизатор" обозначает фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, которое защищает активный ингредиент (например, полипептиды производного fXa) и/или состав от химической и/или физической деградации во время производства, хранения и применения. Примеры стабилизаторов могут включать сахарозу, аргинин, цитрат, маннит, трегалозу, глицин, хлорид натрия, декстран и глюкозу. В одном аспекте стабилизатор представляет собой сахарозу.

В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет по меньшей мере около 0,5% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет по меньшей мере около 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) не превышает около 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5 или 2% (мас./об.). В одном аспекте концентрация стабилизатора в водном составе (например, сахарозы) составляет от около 1% до около 5% или от около 1% до около 4%, или от около 1% до около 3%, или от около 1,5% до около 2,5%, или от около 1,6% до около 2,4%, или от около 1,7% до около 2,3%, или от около 1,7% до около 2,2%, или от около 1,9% до около 2,1%, или около 1, 1,5, 2, 2,5 или 3% (мас./об.).

В некоторых аспектах водный состав может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество, буфер, регулятор тоничности, криопротектор, поверхностно-активное вещество, лиопротектор, консервант или их комбинации.

В некоторых аспектах водный состав имеет pH, который составляет 6 или более, или 6,5 или более, или 7 или более, или 7,5 или более. В некоторых аспектах pH не превышает 9, 8,5 или 8. В некоторых аспектах pH составляет между 6 и 9, между 6,5 и 8,5, между 7 и 8,5, между 7,5 и 8,2, между 7,6 и 8,1, между 7,7 и 7,9 или около 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8.

В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 10 мг/мл двухцепочечного г-антидота, при этом состав имеет pH около 7,8. В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 20 мг/мл двухцепочечного г-антидота, при этом состав имеет pH около 7,8. В одном аспекте водный состав содержит около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 40 мг/мл двухцепочечного г-антидота, при этом состав имеет pH около 7,8. В одном аспекте водный состав дополнительно содержит 0,01-0,02% (мас./об.) полисорбата 80 и буфер.

#### В. Лиофилизация и лиофилизированные композиции.

Также в некоторых вариантах реализации изобретения предложены способы лиофилизации водных составов согласно настоящему изобретению. В одном аспекте в изобретении предложен стабильный цикл лиофилизации, проиллюстрированный в табл. 8.2, который включает этап замораживания, изотермический этап, этап отжига, этап первичной сушки и этап вторичной сушки.

В другом аспекте цикл лиофилизации включает этапы, описанные в табл. 6. Дополнительно следует отметить, что после определения подходящего для лиофилизации водного раствора способ лиофилизации раствора может быть получен в соответствии со способами, известными в данной области техники. В одном аспекте один или более, или все этапы сушки осуществляют при температуре -40°C или выше. В одном аспекте этапы сушки осуществляют при температуре -35°C, -30°C, -25°C, -20°C, -10°C или 0°C или выше, но не выше чем 10°C, 15°C, 20°C или 25°C.

В некоторых аспектах также предложены лиофилизированные композиции, полученные лиофилизацией водного состава согласно настоящему изобретению. На основании концентрации каждого агента в водном составе можно легко определить относительное содержание агента в лиофилизированной композиции.

В одном аспекте лиофилизированная композиция содержит по меньшей мере 5% или, в альтернативном варианте, по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30 или 35% (мас./мас.) полипептида производного fXa. Тогда среди других основных ингредиентов, например, массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит может находиться в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-6). В некоторых аспектах массовое соотношение L-аргинин HCl:сахароза:маннит находится в диапазоне (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5) или (0,91-0,99):(1,6-2,4):(4,6-5,4), или (0,92-0,98):(1,7-2,3):(4,7-5,3), (0,93-0,97):(1,8-2,2):(4,8-5,2), или (0,94-0,96):(1,9-2,1):(4,9-5,1). В некоторых аспектах лиофилизированная композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество и/или твердофазную часть буфера.

В некоторых аспектах предложен раствор, полученный путем растворения лиофилизированной композиции согласно настоящему изобретению в растворителе. В некоторых аспектах растворитель представляет собой воду или солевой раствор. В одном аспекте растворитель представляет собой воду. В одном аспекте раствор содержит по меньшей мере 5 мг/мл или, в альтернативном варианте, по меньшей мере 10 мг/мл целевого полипептида.

В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержащая по меньшей мере 10% (мас./мас.) г-антидота и L-аргинин HCl:сахароза:манин в массовом соотношении около 0,95:2:5. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержащая по меньшей мере 20% (мас./мас.) г-антидота и L-аргинин HCl:сахароза:манин в массовом соотношении около 0,95:2:5. В одном варианте реализации в настоящем изобретении предложена лиофилизированная композиция, содержащая по меньшей мере 40% (мас./мас.) г-антидота и L-аргинин HCl:сахароза:манин в массовом соотношении около 0,95:2:5.

### III. Способы применения составов.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим способам лечения, предотвращения или уменьшения кровотечения у субъекта, проходящего терапию антикоагулянтами с ингибитором fXa, включающие введение субъекту эффективного количества лиофилизированного состава после его растворения в подходящем растворителе. Подразумевается, что антидоты или производные согласно настоящему изобретению могут представлять собой лекарственные составы с коротким временем действия для применения в отдельных или неотложных ситуациях, которые могут безопасно и специфически нейтрализовать традиционные антикоагулирующие свойства ингибитора fXa, не вызывая вредные гемодинамические побочные эффекты или обострение пролиферативной сосудистой реакции на повреждение.

Употребляемый в данном документе термин "лечение" и ему подобные термины используются в смысле достижения желаемого фармакологического и/или физиологического действия. Действие может быть профилактическим в терминах полного или частичного предотвращения нарушения или его признака или симптома и/или может быть терапевтическим в терминах частичного или полного излечения нарушения и/или отрицательного явления, связанного с нарушением.

"Лечение" также включает любое лечение нарушения у млекопитающего и включает: (a) предотвращение появления нарушения у субъекта, который может быть предрасположен к нарушению, но у которого его еще могли не диагностировать, например, предотвращение кровотечения у пациента с передозировкой антикоагулянтов; (b) подавление нарушения, т.е. прекращение развития, например, подавление кровотечения; или (c) облегчение или ослабление нарушения, например, уменьшение кровотечения.

В контексте данного документа "лечить" дополнительно включает системное облегчение симптомов, связанных с патологией, и/или замедление начала появления симптомов. Клинические и субклинические показатели "лечения" будут варьироваться в зависимости от патологии, индивида и лечения.

"Введение" может производиться в рамках одной дозы, непрерывно или с интервалами в течение курса лечения. Способы определения наиболее эффективных путей и доз введения известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от композиции, применяемой для терапии, цели терапии, клетки-мишени, лечение которой осуществляется, и субъекта, лечение которого осуществляется. Одноразовое или многоразовое введение можно проводить, используя уровень и схему дозирования, выбранные лечащим врачом. Подходящие дозированные составы и способы введения агентов известны в данной области техники. "Субъектом" для диагностирования или лечения является клетка или млекопитающее, включая человека. Отличные от человека животные-субъекты для диагностирования или лечения включают, например, мышиных, таких как крысы, мыши, собачьих, таких как собаки, заячьих, таких как кролики, сельскохозяйственных животных, спортивных животных и домашних животных.

Агенты и композиции согласно настоящему изобретению можно применять в производстве медикаментов и для лечения людей и других животных путем введения в соответствии с традиционными процедурами, например, в виде активного ингредиента в фармацевтических композициях.

Агент согласно настоящему изобретению можно вводить для осуществления терапии любым подходящим путем, в частности, путем парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное и внутрикожное) введения. Также следует понимать, что предпочтительный путь будет варьироваться в зависимости от состояния и возраста реципиента и заболевания, лечение которого проводят.

Выражение "фармацевтически приемлемый полимер" относится к группе соединений, которые можно конъюгировать к одному или более описанным в данном документе полипептидам. Предполагается, что конъюгация полимера к полипептиду может продлевать время полужизни полипептида *in vivo* и *in vitro*. Неограничивающие примеры включают полиэтиленгликоли, поливинилпирролидоны, поливиниловые спирты, производные цеплюлозы, полиакрилаты, полиметакрилаты, сахара, полиолы и их смеси.

"Антикоагулирующие агенты" или "антикоагулянты" представляют собой агенты, которые ингибирывают образование кровяных сгустков. Примеры антикоагулирующих агентов включают, но не ограничиваются этим, специфические ингибиторы тромбина, фактор IXa, фактор Xa, фактор XIa, фактор XIIa или фактор VIIa, гепарин и производные, антагонистов витамина K и антитела против тканевого фактора. Примеры специфических ингибиторов тромбина включают хирудин, бивалирудин (Ангиомакс®), аргатробан и лепирудин (Рефлудан®). Примеры гепарина и производных включают нефракционированный гепарин (НФГ), низкомолекулярный гепарин (НМГ), такой как эноксапарин (Ловенокс®), дальтепарин

(Фрагмин®) и данапароид (Оргаран®); и синтетический пентасахарид, такой как фондапаринукс (Арикстра®). Примеры антагонистов витамина К включают варфарин (Кумадин®), фенокумарол, аценокумарол (Синтром®), хлориндион, дикумарол, дифенадион, этилбискумасетат, фенпрокумон, фениндион и тиокломарол. В одном варианте реализации изобретения антикоагулянт представляет собой ингибитор фактора Xa. В одном варианте реализации изобретения антикоагулянт представляет собой бетриксабан.

"Терапия антикоагулянтами" относится к терапевтической схеме, которую применяют в отношении пациента, чтобы предотвратить нежелательное образование кровяных сгустков или тромбоз. Терапия антикоагулянтами включает введение одного или комбинации из двух или более антикоагулирующих агентов или других агентов в дозировке и согласно схеме, подходящих для лечения или предотвращения нежелательного образования кровяных сгустков или тромбоза у пациентов.

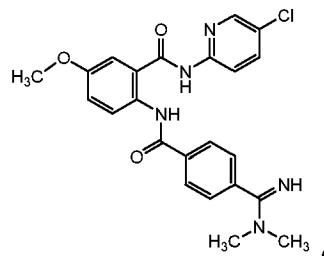
Термин "ингибиторы фактора Xa" относится к соединениям, которые могут ингибирировать, прямым или непрямым образом, коагулирующую активность фактора Xa, состоящую в катализе преобразования протромбина в тромбин, *in vitro* и/или *in vivo*.

"Прямые ингибиторы фактора Xa" напрямую связываются с fXa, а их неограничивающие примеры включают NAP 5, rNAPc2, ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), DX DX-9065a (описанный, например, в Herbert, J.M., et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 276(3):1030-8), YM-60828 (описанный, например, в Taniuchi, Y., et al., *Thromb Haemost.* 1998 79 (3):543-8), YM-150 (описанный, например, в Eriksson, B.I. et al., *Blood* 2005;106 (11), Abstract 1865), апиксабан, ривароксабан, TAK 442, PD-348292 (описанный, например, в Pipeline Insight: Antithrombotics - Reaching the Untreated Prophylaxis Market, 2007), отамиксабан, эдоксабан (описанный, например, в Hylek EM, *Curr Opin Invest Drugs* 2007 8(9):778-783), LY517717 (описанный, например, в Agnelli, G., et al., *J. Thromb. Haemost.* 2007 5(4):746-53), GSK913893, разаксабан, бетриксабан или их фармацевтически приемлемую соль и их комбинации. В конкретном аспекте прямой ингибитор фактора Xa представляет собой ривароксабан. В некоторых аспектах прямой ингибитор fXa представляет собой низкомолекулярное химическое соединение.

Ингибирирование активности fXa "непрямыми ингибиторами фактора Xa" опосредуется одним или более другими факторами. Неограничивающие примеры непрямых ингибиторов фактора Xa включают фондапаринукс, идрапаринукс, биотинилированный идрапаринукс, эноксапарин, фрагмин, тинзапарин, низкомолекулярный гепарин ("НМГ") и их комбинации. В конкретном аспекте непрямой ингибитор фактора Xa представляет собой эноксапарин.

В одном варианте реализации изобретения ингибитор фактора Xa выбран из бетриксабана, ривароксабана, НМГ, DX-9065a, YM-60828, YM-150, PD-348292, отамиксабана, эдоксабана, LY517717, GSK913893, разаксабана, апиксабана и их комбинаций.

Термин "бетриксабан" относится к соединению "[2-({4-[(диметиламино)иминометил]фенил}карбониламино)-5-метоксифенил]-N-(5-хлоро(2-пиридинил))карбоксамида" или его фармацевтически приемлемым солям. "[2-({4-[(диметиламино)иминометил]фенил}карбониламино)-5-метоксифенил]-N-(5-хлоро(2-пиридинил))карбоксамид" относится к соединению, имеющему следующую структуру:



или его таутомеру или фармацевтически приемлемой соли.

Бетриксабан описан в патентах США № 6376515 и 6835739 и публикации патентной заявки США № 2007/0112039, поданной 7 ноября 2006 г., содержание которых включено в данный документ посредством ссылки. Известно, что бетриксабан является специфическим ингибитором фактора Xa.

"Нейтрализовать", "обращать" или "противодействовать" активности ингибитора fXa или сходные выражения относятся к ингибирированию или блокированию ингибирующей фактор Xa или антикоагулирующей функции ингибитора fXa. Такие выражения относятся к частичному ингибирированию или блокированию функции, а также к ингибирированию или блокированию большей части или всей активности ингибитора fXa *in vitro* и/или *in vivo*.

"Эффективное количество" относится к количеству производного, достаточному, чтобы индуцировать необходимый биологический и/или терапевтический результат. Этим результатом может быть ослабление признаков, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение в биологической системе. В настоящем изобретении результат, как правило, включает одно или более из следующего: нейтрализацию ингибитора fXa, который вводили пациенту, прекращение антикоагулирующей активности ингибитора fXa, удаление ингибитора fXa из плазмы, восстановление гемостаза и уменьшение или прекращение кровотечения. Эффективное количество будет варьироваться в зависимости от конкретного применяемого антидота, конкретного ингибитора fXa, который вводили субъекту, режима

дозирования ингибитора fXa, расписания введения антидота, субъекта и болезненного состояния, лечение которого проводят, массы и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и тому подобного, что легко может быть определено специалистом в данной области техники.

В определенных аспектах раствор вводят, чтобы доставить количество производного fXa (например, г-антидота), составляющее от около 10 миллиграммов (мг) до около 2 граммов (г). Другие применяемые количества г-антидота включают от около 100 мг до около 1,5 г; от около 200 мг до около 1 г; и от около 400 мг до около 900 мг. В некоторых аспектах применяемое количество г-антидота составляет около 400 мг или 960 мг. В некоторых аспектах применяемое количество г-антидота составляет от около 10 мг до около 100 мг; от около 15 мг до около 95 мг; и от около 20 мг до около 80 мг.

В другом варианте реализации изобретения раствор вводят в нейтрализующем количестве, которое соответствует по меньшей мере около 1:1 молярному соотношению концентрации г-антидота в системе кровообращения и концентрации ингибитора фактора Xa в системе кровообращения, в течение периода, составляющего по меньшей мере около 30 мин. В других вариантах реализации изобретения молярное соотношение составляет около 1:1 или около 2:1, или около 4:1.

При введении состав нейтрализует ингибитор фактора Xa по меньшей мере на около 20% или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 75%, или по меньшей мере на около 90%, или по меньшей мере на около 95%.

Определить, достигнуто ли осуществление способа, т.е. ингибиование или обращение действия ингибитора фактора Xa, можно с помощью большого числа *in vitro* методов анализа, таких как анализ тромбинообразования и клинические методы анализа коагулирующей активности, такие как aPTT, РТ и АСТ.

Один аспект настоящего изобретения относится к способам избирательного связывания и ингибиования экзогенно вводимого ингибитора fXa у субъекта, проходящего терапию антикоагулянтами с ингибитором fXa, включающим введение субъекту эффективного количества раствора лиофилизированного состава. Пациенты, подходящие для этой терапии, ранее проходили терапию антикоагулянтами, например, им вводили один или более антикоагулянтов, таких как прямые или непрямые ингибиторы fXa.

В некоторых вариантах реализации изобретения раствор вводят после введения слишком большой дозы ингибитора fXa перед хирургической операцией, что может подвергнуть субъектов риску кровоизлияния. Субъект может быть клеткой или млекопитающим, таким как человек.

В другом аспекте предложенный в данном документе способ заключается в избирательном связывании и ингибиовании экзогенно водимого ингибитора фактора Xa у субъекта, проходящего терапию антикоагулянтами, с ингибитором фактора Xa, и включает введение субъекту раствора лиофилизированного состава. Субъект может быть клеткой или млекопитающим, таким как человек.

Субъекты, на которых введение описанного в данном документе растворенного лиофилизированного состава и применение сопутствующих способов окажет благоприятное действие, включают тех, кто подвержен или предрасположен к клиническому обширному кровотечению или клинически значимому необширному кровотечению. Примеры клинических обширных кровотечений выбраны из группы, состоящей из кровоизлияния, кровоизлияния в жизненно важные органы, кровотечения, требующего проведения повторной операции или новой терапевтической процедуры, и индекса кровоточивости  $\geq 2,0$  со связанным с ним явным кровотечением. (Turpie AGG, et al., NEJM, 2001, 344: 619-625). Кроме того, субъект может быть подвержен или предрасположен к необширному кровотечению, выбранному из группы, состоящей из носового кровотечения, являющегося постоянным или повторяющимся и имеющего достаточный объем или не останавливающегося без вмешательства, кровотечения в прямой кишке или мочевыводящих путях, которое не достигает уровня, требующего терапевтической процедуры, сильных гематом в местах инъекций или других местах, которые являются спонтанными или возникают при рядовых травмах, значительной потери крови, превышающей обычно связанную с хирургической процедурой, которая не требует дренирования, и кровотечения, требующего незапланированной трансфузии.

В некоторых вариантах реализации изобретения растворенный лиофилизированный состав вводят после введения слишком большой дозы ингибитора fXa или перед хирургической операцией, которая может подвергнуть субъекта риску кровоизлияния.

Следует понимать, что в любом из описанных в данном документе способов, даже если это не всегда четко указано, эффективное количество растворенного лиофилизированного состава вводят субъекту. Количество может быть эмпирически определено лечащим врачом и будет варьироваться в зависимости от возраста, пола, массы и состояния здоровья субъекта. Дополнительные факторы, которые следует учитывать лечащему врачу, включают, но не ограничиваются этим тип и/или количество ингибитора фактора Xa, который могли вводить, способ или путь предполагаемого введения лиофилизированного состава субъекту и терапевтическую конечную точку для пациента. Учитывая эти переменные, специалист в данной области введет терапевтически эффективное количество субъекту, лечение которого необходимо провести.

### Примеры

Дополнительное понимание изобретения обеспечивают ссылки на следующие примеры, которые

являются исключительно иллюстрациями изобретения. Объем настоящего изобретения не ограничен приведенными в качестве примеров вариантами реализации, которые являются лишь иллюстрациями отдельных аспектов изобретения. Любые функционально эквивалентные способы входят в объем изобретения. После изучения вышеупомянутого описания и прилагаемых фигур специалистам в данной области техники станут очевидны различные модификации изобретения в дополнение описанного в данном документе. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Если не указано иное, все значения температуры приведены в градусах Цельсия. Также в этих примерах и в других местах аббревиатуры имеют следующие значения:

|            |   |                                |             |
|------------|---|--------------------------------|-------------|
| ч          | = | час                            |             |
| МКН        | = | международный                  | коэффициент |
|            |   | нормализации                   |             |
| ВВ         | = | внутривенный                   |             |
| КГ         | = | килограмм                      |             |
| М          | = | молярный                       |             |
| МГ         | = | миллиграмм                     |             |
| МГ/КГ      | = | миллиграмм/килограмм           |             |
| МГ/МЛ      | = | миллиграмм/миллилитр           |             |
| МИН        | = | минута                         |             |
| МЛ         | = | миллилитр                      |             |
| ОТП        | = | обедненная тромбоцитами плазма |             |
| БТП        | = | богатая тромбоцитами плазма    |             |
| ПВ         | = | протромбиновое время           |             |
| Е/МЛ       | = | единиц/миллилитр               |             |
| МЛ ИЛИ МКЛ | = | микролитр                      |             |
| МКМ        | = | Микромолярный                  |             |

#### Пример 1. Получение г-антидота.

Цитратно-фосфатные (20 мМ) буферы с ионной силой 0,15 (доведенные NaCl) получали, используя моногидрат лимонной кислоты (Fisher, Pittsburgh, PA) и безводный двухосновный фосфат натрия (Sigma, St. Louis, MO), а pH доводили, используя 6 М HCl или 6 М NaOH. Фосфатный (20 мМ) буфер без дополнительной соли получали путем растворения 6,61 г безводного двухосновного фосфата натрия в 2,0 л воды Mili-Q, а pH доводили до 7,5. Для получения фосфатного (20 мМ) буфера с содержанием соли (I=0,15 M) в описанный выше фосфатный буфер добавляли 14,8 г NaCl. Все другие реагенты были приобретены у Sigma (St. Louis, MO), если не указано иное.

Полипептид г-антидота (SEQ ID NO: 3) хранили в маточном растворе с концентрацией приблизительно 5 мг/мл в 10 мМ триплекс, pH 8,0, содержащем 2% аргинина. Диализ г-антидота проводили при 4°C, используя кассеты для диализа Slide-A-Lyzer®, 3000 MWCO (Pierce, Rockford, IL), против цитратно-фосфатных буферов с выбранными значениями pH. Чтобы предотвратить агрегацию во время диализа, перед загрузкой в кассеты маточный раствор белка разводили до 0,5 мг/мл отфильтрованным буфером для диализа. После диализа г-антидот разводили до 0,3 мг/мл и измеряли концентрацию белка методом спектроскопии УФ-поглощения ( $A_{280}$ ), используя коэффициент экстинкции  $1,16 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ . Полученный таким способом г-антидот использовали в следующих примерах.

#### Пример 2. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для отслеживания стабильности.

Эксперименты по дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) проводили с помощью автоматического капиллярного ДСК-калориметра Microcal с камерой для загрузки образцов с регулируемой температурой. Измерение изменения температуры проводили от 6-100°C со скоростью сканирования 60°C/ч и 25-минутным периодом уравновешивания перед сканированием. В сравнительной ячейке использовали подходящий совместимый буфер, а типичная концентрация образцов в совместимом буфере составляла ~0,6 мг/мл. Перед анализом контрольную сканограмму буфер против буфера вычитали из сканограмм всех образцов и нормировали термограммы по концентрации. Данные обрабатывали с помощью прилагающегося программного обеспечения от Microcal. Эндотермические пики аппроксимировали одним пиком, используя небинарную функцию аппроксимации, а значения температуры перехода ( $T_m$ ) рассчитывали с помощью функции аппроксимации. Значения начальных температур (Tonset) определяли по отклонению эндотермического пика от низкотемпературной базовой линии.

ДСК часто применяют, чтобы показать присутствие множественных популяций в гетерогенном образце. С помощью планшет-ридер для ДСК от Wyatt проводили измерения для 10-20 мкл белкового раствора (0,3 мг/мл) в разных условиях pH в одной серии экспериментов при 20°C. Образцы центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, чтобы удалить пузырьки воздуха, и получали 5 сканограмм по 20 с на каждую, чтобы получить средний радиус образца. При pH 5,0-7,5 наблюдали одиночную популяцию с гидродинамическим радиусом ~3 нм.

#### Пример 3. Определение стабилизаторов.

Данные из примера 2 продемонстрировали, что г-антидот в целом был стабилен при pH 7,5. Поэтому исследования с целью выбора вспомогательных веществ проводили при pH 7,5 в 20 мМ фосфатном

буфере. Гидродинамический диаметр белка измеряли с помощью планшет-ридера для динамического рассеяния света Dynapro (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA). Гидродинамический диаметр рассчитывали по коэффициенту диффузии с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна, используя метод семиинвариантов (на основании логарифмического нормального распределения). Результаты измерений применяли для оценки гомогенности поставляемых образцов.

Планшет-ридер SpectraMax M3 сначала использовали для выявления потенциальных стабилизирующих вспомогательных веществ путем отслеживания кинетики агрегации белка при 60°C, pH 7,5, с 0,3 мг/мл белка с или без вспомогательных веществ. Всего было исследовано 32 вспомогательных вещества из библиотеки вспомогательных веществ, в общем случае считающихся безопасными (GRAS), которые перечислены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Перечень вспомогательных веществ и концентрации, исследованные кинетическим методом при ОП 350

| Вспомогательное вещество | Концентрация | Вспомогательное вещество | Концентрация |
|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| Декстран сульфат         | 0,0075 мМ    | Твин 20                  | 0,10%        |
| Декстран T70             | 0,0075 мМ    | Твин 80                  | 0,10%        |
| Аскорбиновая кислота     | 0,15 М       | Плюроник F-68            | 0,10%        |
| Аспарагиновая кислота    | 0,15 М       | Альбумин                 | 5,00%        |
| Глутаминовая кислота     | 0,15 М       | Желатин                  | 5,00%        |
| Молочная кислота         | 0,15 М       | Лактоза                  | 20,0%        |
| Яблочная кислота         | 0,15 М       | Трегалоза                | 10,00%       |
| Аргинин                  | 0,3 М        | Декстроза                | 20,00%       |
| Дизтаноламин             | 0,3 М        | Сахароза                 | 20,0%        |
| Гуанидин                 | 0,3 М        | Маннит                   | 10,00%       |
| Лизин                    | 0,3 М        | Сорбитол                 | 20,00%       |
| Пролин                   | 0,3 М        | Глицерин                 | 20,00%       |
| Глицин                   | 0,3 М        | α-циклогексстрин         | 2,50%        |
| Хлорид кальция           | 0,015 М      | 2-ОН пропил β-ЦД         | 10,00%       |
| Цитрат натрия            | 0,2 М        | 2-ОН пропил γ-ЦД         | 10,00%       |
| Brij 35                  | 0,10%        | ЭДТА                     | 1 мМ и 5 мМ  |

Было определено, что среди всех исследованных вспомогательных веществ наибольшее стабилизирующее действие оказывают сахароза, сорбитол и цитрат. Последующие исследования действия комбинаций вспомогательных веществ на стабильность белка базировались на этих трех вспомогательных веществах, как обобщено в табл. 4.2. Эксперименты с расплавами при ОП 350 нм проводили в двух повторностях, а значения  $\Delta T$  для каждого состава рассчитывали, как описано выше. На основании приведенных в табл. 2 значений  $\Delta T$  определили, что составы 3, 4, 5 и 6 имеют наибольшее стабилизирующее действие.

Таблица 4.2. Перечень комбинаций исследуемых вспомогательных веществ и соответствующих значений  $\Delta T$  и осмоляльности растворов.

| № | Компоненты                                    | $\Delta T$ (°C) | Осмоляльность (мОсм/кг) |
|---|---|-----------------|-------------------------|
| 1 | Сахароза 10%+Сорбитол 5%                      | 3,1             | 943 ± 13                |
| 2 | Сахароза 5%+Сорбитол 10%                      | 3,8             | 1066 ± 8                |
| 3 | Сахароза 10%+Сорбитол 5%+Цитрат натрия 0,05 М | > 10,0          | 1098 ± 21               |
| 4 | Сахароза 5%+Сорбитол 10%+Цитрат натрия 0,05 М | > 10,0          | 1253 ± 8                |
| 5 | Сахароза 5%+Сорбитол 5%+Цитрат натрия 0,05 М  | 6,2             | 863 ± 10                |
| 6 | Сахароза 10%+Цитрат натрия 0,05 М             | 6,5             | 755 ± 9                 |
| 7 | Сорбитол 10%+Цитрат натрия 0,05 М             | 5,8             | 1008 ± 6                |

$\Delta T$  - разница между температурами перехода одного белка и белка с разными комбинациями вспомогательных веществ при pH 7,5. Осмоляльность усреднена по трем измерениям, а  $\Delta T$  усреднена по двум измерениям.

Агрегационные свойства терапевтического белка в этих составах дополнительно исследовали методом плавления при ОП 350 нм в 20 мМ фосфатном буфере при pH 7,5 без NaCl в этих комбинированных составах. В общем случае степень агрегации намного ниже в отсутствии NaCl. В действительности плавление при ОП 350 нм изначально проводили, начиная с 35-75°C, и так как очевидной агрегации не на-

блюдали, эксперименты по плавлению проводили повторно с теми же образцами от 75 до 100°C. Таким образом, на кривой ОП 350 нм можно наблюдать разрыв при 75°C вследствие ~10 мин выдержки при этой температуре. Для белков в составах 3, 4, 5 и 6 не наблюдали никакой очевидной агрегации даже после повышения температуры до 100°C. Другим преимуществом удаления дополнительного NaCl является то, что соответствующая осмоляльность составов намного ниже по сравнению с составами с NaCl.

#### Пример 4. Исследование растворимости.

В этом примере исследовали влияние pH, температуры, стабилизаторов (например, цитрата, аргинина, глицина и лизина) и ионной силы на растворимость г-антитода.

#### Материалы и методы.

Применяемым материалом был раствор г-антитода (4,8 мг/мл) в 10 mM трикс, pH 8,0, и 2% аргинина. В случае растворимости при комнатной температуре (КТ) исследования проводили методом физического наблюдения в течение по меньшей мере 1-2 ч. В случае растворимости при 5°C образцы уравновешивали при 5°C в течение ночи и проводили физическое наблюдение образцов. Кроме того, образцы центрифугировали при 5°C в течение 15 мин, а концентрацию белка в супернатанте анализировали по УФ A<sub>280</sub> нм (двойное разведение). Исходный маточный раствор анализировали ежедневно в качестве контроля.

Когда наблюдали осаждение белка, растворимость, определяемую по концентрации в супернатанте, представляли в виде <XX мг/мл (окрашенные столбики на соответствующих фигурах). Это происходило вследствие наличия избыточного количества белка и преимущественного осаждения субпопуляции белка, имеющей PI, близкий к pH буфера. Когда осаждение белка не наблюдали, растворимость, определяемую по концентрации в растворе, представляли в виде >XX мг/мл (пустые столбики на фигурах).

Влияние pH на растворимость при комнатной температуре исследовали при разных pH, включая 5,0, 6,0, 7,0 и 8,0. Как показано на фиг. 1A, г-антитод обладал наибольшей растворимостью при pH 8,0 (42,2 мг/мл с отсутствием видимого осаждения). В противоположность этому растворимость при pH 5,0, 6,0 и 7,0 составляла соответственно 3,5 мг/мл (отсутствие осаждения), 12,3 мг/мл (наблюдаемое осаждение) и 24,4 мг/мл (наблюдаемое осаждение).

В табл. 5.1 перечислены образцы, исследованные в отношении растворимости при 5°C. Как показано, буфер UF состоит из 42 mM МЭС, 4 mM фосфата натрия, 833 mM NaCl, 8 mM трикс и 58 mM аргинина, концентрированных до ~5 мг/мл.

Таблица 5.1. Образцы, исследованные в отношении растворимости г-антитода при разных pH с разными солюбилизаторами (цитратом или аргинином)

| Образец              | Композиция  | Цитрат/Аргинин | pH (± 0,02) | Рассчитанная осмоляльность |
|----------------------|---|----------------|-------------|----------------------------|
| 10 mM цитрата        | 10 mM фосф. Na, 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80, 10 mM цитрата          | 10 mM цитрата  | 7,30        | 353                        |
| 3 mM цитрата         | 10 mM фосф. Na, 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80, 3 mM цитрата           | 3 mM цитрата   | 7,30        | 325                        |
| 0 mM цитрата pH 7,80 | 10 mM фосф. Na, 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80                         | 0 mM цитрата   | 7,30        | 313                        |
| pH 7,55              | 10 mM фосф. Na, 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80                         | н/д            | 7,80        | 313                        |
| Буфер UF             | 42 mM МЭС, 4 mM фосф. Na, 833 mM NaCl, 8 mM трикс, 58 mM аргинина | 58 mM аргинина | 7,48        | 1942                       |

При pH 7,3 10 mM цитрата немного улучшили растворимость антитода при 5°C. Без цитрата или аргинина растворимость при 5°C менялась в следующем порядке: pH 7,55 > pH 7,80 > pH 7,30 (фиг. 1B). Буфер UF (pH 7,48) имел наилучшую растворимость (50 мг/мл), вероятно, вследствие наличия 58 mM Arg+833 mM NaCl при подходящем pH, 7,5 (фиг. 1B).

В табл. 5.2 перечислены образцы для исследования влияния аргинина по сравнению с цитратом при pH 7,55. Как показано на фиг. 1C, при pH 7,55 как цитрат, так и аргинин существенно улучшили растворимость г-антитода при 5°C. Кроме того, оказалось, что цитрат был эффективнее аргинина при той же молярности: -10 mM цитрата ~50 mM аргинина >20 mM аргинина > 10 mM аргинина.

Таблица 5.2 Образцы, исследованные в отношении растворимости г-антидота в цитрате и аргинине при pH 7,55

| Образец        | Композиция   | Цитрат/Аргинин | pH (± 0,02) | Рассч. осм. |
|----------------|--|----------------|-------------|-------------|
| 0 mM           | 10 mM фосф. Na 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80 (группа 1)    | н/д            | 7,55        | 313         |
| 10 mM цитрата  | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 10 mM цитрата  | 10 mM цитрата  | 7,55        | 307         |
| 10 mM аргинина | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 10 mM аргинина | 10 mM аргинина | 7,55        | 297         |
| 20 mM аргинина | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM аргинина | 20 mM аргинина | 7,55        | 327         |
| 50 mM аргинина | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 50 mM аргинина | 50 mM аргинина | 7,55        | 417         |

Влияние аргинина по сравнению с цитратом дополнительно исследовали при pH 7,8 и 8,0, используя образцы из табл. 5.3. Фиг. 1D показывает, что г-антидот имел немного большую растворимость при pH 8,0, чем при pH 7,8 при 5°C. Как 10 mM цитрата, так и 20 mM аргинина улучшали растворимость по меньшей мере до 15 мг/мл при pH 7,8 и 8,0.

Таблица 5.3. Образцы, исследованные в отношении растворимости г-антидота в цитрате и аргинине при pH 7,8 и 8

| Образец                | Исходная композиция                                    | Дополнительный цитрат/аргинин | pH (± 0,02) | Рассч. осм. |
|------------------------|--|-------------------------------|-------------|-------------|
| pH 7,8                 | 10 mM фосф. Na 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80 (set 1)       | н/д                           | 7,80        | 313         |
| pH 7,8, 10 mM цитрата  | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 10 mM цитрата  | 10 mM цитрата                 | 7,80        | 307         |
| pH 7,8, 20 mM аргинина | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM аргинина | 20 mM аргинина                | 7,80        | 327         |
| pH 8,0                 | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80                 | н/д                           | 8,00        | 267         |
| pH 8,0, 10 mM цитрата  | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 10 mM цитрата  | 10 mM цитрата                 | 8,00        | 307         |
| pH 8,0, 20 mM аргинина | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM аргинина | 20 mM аргинина                | 8,00        | 327         |
| Трис/аргинин           | 10 mM трикс, 2% аргинина                               | 114 mM аргинина               | 8,00        | 352         |

Влияние аргинина также сравнивали с глицином и лизином при pH 7,8 (табл. 5.4), а результаты показаны на фиг. 1E. Как показано на фигуре, глицин и лизин не оказывали влияния на растворимость г-антидота при 5°C, а более солубилизирующее действие наблюдали для 20 mM аргинина при pH 8,0 по сравнению с pH 7,55 при 5°C.

Таблица 5.4. Образцы, исследованные в отношении растворимости г-антидота в глицине, лизине и аргинине при pH 7,8

| Образец                           | Исходная композиция   | Дополнительный глицин/лизин/аргинин | pH (± 0,02) | Рассч. осм. |
|-----------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|-------------|
| pH 7,80                           | 10 mM фосф. Na 9,5% сахарозы, 0,01% ПС80                          | н/д                                 | 7,80        | 313         |
| pH 7,8, 20 mM глицина             | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM глицина             | 20 mM глицина                       | 7,80        | 307         |
| pH 7,8, 20 mM лизина              | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM Lys                 | 20 mM лизина                        | 7,80        | 327         |
| pH 7,8, 20 mM аргинина (группа 3) | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80, 20 mM аргинина (группа 3) | 20 mM аргинина                      | 7,80        | 327         |
| pH 7,55, 20 mM аргинина           | 10 mM фосф. Na 8% сахарозы, 0,01% ПС80                            | 20 mM аргинина                      | 7,55        | 327         |

Также исследовали влияние ионной силы на растворимость г-антидота (табл. 5.5). Как показано на фиг. 1F, ионная сила повышала растворимость г-антидота при 5°C в отсутствие аргинина или цитрата, а наиболее выражено это влияние было при ионной силе  $> 0,10 \text{ M}$ .

Таблица 5.5. Образцы, исследованные в отношении растворимости г-антидота при разной ионной силе при pH 7,8

| Образец                            | Исходная композиция                             | Дополнительный глицин/лизин/аргинин | pH (± 0,02) | Рассч. осм. |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|-------------|-------------|
| pH 7,8, 0,03<br>М<br>ИС (группа 1) | 10 mM фосф., 8% сахарозы, 0,01% твин 80, 100 мл | н/д                                 | 7,80        | 277         |
| pH 7,8, 0,03<br>М<br>ИС            | 10 mM фосф., 8% сахарозы, 0,01% твин 80, 100 мл | н/д                                 | 7,80        | 277         |
| pH 7,8, 0,10<br>М ИС               | 10 mM фосф., 8% сахарозы, 0,01% твин 80, 100 мл | н/д                                 | 7,80        | 417         |
| pH 7,8, 0,30<br>М<br>ИС            | 10 mM фосф., 8% сахарозы, 0,01% твин 80, 100 мл | н/д                                 | 7,80        | 817         |
| pH 7,8, 1,00<br>М ИС               | 10 mM фосф., 8% сахарозы, 0,01% твин 80, 100 мл | н/д                                 | 7,80        | 2217        |

В целом этот пример демонстрирует, что при комнатной температуре в отсутствие солюбилизирующего агента, такого как аргинин и цитрат, г-антидот имеет наибольшую растворимость при pH 8,0. При 5°C, pH 8,0 был оптимальным для г-антидота. Кроме того, как цитрат, так и аргинин существенно улучшают растворимость г-антидота при 5°C. Однако глицин и лизин, которые оба повышают  $T_m$  для г-антидота, не влияют на растворимость. В целом наибольшая растворимость г-антидота при 5°C была достигнута при pH 7,8 с 95 mM аргинина. Через 10 дней не наблюдали никакого осаждения.

#### Пример 5. Начальный процесс лиофилизации.

Процесс лиофилизации был разработан с помощью консервативного подхода, базирующегося на понимании физической природы компонентов состава на разных этапах цикла лиофилизации. Для измерения  $T_g'$  (температуры стеклования замороженного концентрата) и  $T_c$  (температуры разрушения во время первичной сушки) применяли методы определения термических характеристик, включая ДСК и микроскопию лиофилизированных составов (МЛП). Цикл, приведенный в табл. 6, был выбран для лиофилизации лиофилизированного продукта. Этап отжига делает возможным, чтобы кристаллизация маннита гарантировала, что температура продукта не будет падать ниже температуры разрушения во время первичной сушки. Температуру первичной сушки выбирали так, чтобы избежать разрушения лепешки при приемлемой продолжительности первичной сушки. 2-этапные условия вторичной сушки разрабатывали так, чтобы получить лиофилизированный состав с уровнем влажности  $< 1\%$ .

Таблица 6. Цикл лиофилизации

| Этап № | Этап процесса     | Описание   |
|--------|-------------------|--|
| 1      | Замораживание     | Охлаждение при 1 °C/мин до -40 °C  |
| 2      | Замораживание     | Изотермическая выдержка при -40°C по меньшей мере 180 мин                      |
| 3      | Отжиг             | Повышение температуры до -20°C при 1 °C/мин и выдержка по меньшей мере 180 мин |
| 4      | Замораживание     | Охлаждение при 1 °C/мин до -40°C и выдержка по меньшей мере 180 мин            |
| 5      | Вакуумирование    | Инициация вакуумирования до 100 мторр  |
| 6      | Первичная сушка   | Повышение температуры при 0,5 °C/мин до 10 °C. Выдержка 40 часов               |
| 7      | Вторичная сушка 1 | Повышение температуры до 30°C при 0,5 °C/мин, выдержка 20 часов при 75 мторр   |

#### Пример 6. Лиофилизация без кристаллизующего компонента.

##### Дизайн эксперимента/исследования.

Готовили десять разных составов, чтобы исследовать влияние буферной композиции, pH, стабилизатора и концентрации лекарственного состава на растворимость и стабильность г-антидота (табл. 7). Составы готовили, используя трис-буфер или фосфатный буфер при pH 7,8 и 8,2. Растворы концентрировали до 10 мг/мл и 25 мг/мл с помощью фильтрования на центрифуге.

Образцы концентрированных растворов, приготовленные в трис- или фосфатном буферах, помещали в условия для изучения краткосрочной стабильности при 2-8°C и 25°C в течение 2 недель. В то же

время образцы каждого раствора использовали для изучения замораживания/размораживания и исследовали в отношении осаждения и агрегации. Образцы для изучения замораживания/размораживания состояли из 0,5 мл каждого состава в 2 мл флаконе из ампульного стекла типа I. 0,5 мл образец проверяли визуально перед замораживанием и после каждого цикла замораживания/размораживания. Каждый образец держали при -80°C в течение приблизительно 2 ч, размораживали приблизительно в течение от 15 до 30 мин при комнатной температуре, проверяли визуально приблизительно в течение 1-2 мин и возвращали в холодильник с температурой -80°C. После каждого 3-го цикла замораживания брали 250 л образец каждого состава и отправляли в лабораторию для анализа. Оставшийся раствор подвергали 2 дополнительным циклам замораживания, а затем отправляли в лабораторию для анализа.

Весь оставшийся раствор лиофилизировали в виде 0,25 мл образцов, используя консервативный цикл, а образцы исследовали в отношении повышенной стабильности при 25°C и 40°C.

Для исследования влияния замораживания/размораживания и лиофилизации на молекулу в отсутствии защитных агентов готовили два дополнительных состава, используя не содержащий полисорбат раствор (составы 5 и 6 в табл. 7). Образцы растворов оставляли и использовали для определения термических характеристик с помощью модулированной ДСК и микроскопии лиофилизованных составов.

Таблица 7. Номера составов, компоненты, концентрации и значения pH

| №  | Компоненты   | Концентрация | pH  |
|----|--|--------------|-----|
| 1A | 10 mM трикс, 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 10 мг/мл     | 7,8 |
| 1B | 10 mM трикс, 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 25 мг/мл     | 7,8 |
| 2A | 10 mM трикс, 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 10 мг/мл     | 8,2 |
| 2B | 10 mM трикс, 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 25 мг/мл     | 8,2 |
| 3A | 10 mM фосф., 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 10 мг/мл     | 7,8 |
| 3B | 10 mM фосф., 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 25 мг/мл     | 7,8 |
| 4A | 10 mM фосф., 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 10 мг/мл     | 8,2 |
| 4B | 10 mM фосф., 4% сахарозы, 95 mM аргинина, ПС80 0,01% | 25 мг/мл     | 8,2 |
| 5  | 10 mM трикс, 95 mM аргинина                          | 25 мг/мл     | 7,8 |
| 6  | 10 mM фосф., 95 mM аргинина                          | 25 мг/мл     | 7,8 |

Составы готовили, используя основное лекарственное вещество, поставляемое в дозировке 3 мг/мл, 3,3 мг/мл и 4,8 мг/мл с или без полисорбата 80 (ПС80).

Сначала готовили составы 5 и 6, используя по 19 мл основного лекарственного раствора для каждого состава. Основной объем помещали в кассету для диализа с 10 К мембраной, а кассету помещали в 2 л буфера с 10 mM трикс или 10 mM фосфата натрия при pH 7,8. Диализ растворов проводили приблизительно в течение 2 ч, раствор для диализа замещали 2 л другого буферного раствора и проводили диализ еще в течение по меньшей мере 2 ч. Раствор из каждой кассеты удаляли и помещали в 10 К пробирки для фильтрования в центрифуге Amicon Ultra Ultrapel. Растворы центрифугировали в течение приблизительно 30 мин при  $\frac{3}{4}$  скорости. Оставшийся раствор удаляли из пробирок для центрифугирования и добавляли 95 mM аргинина с последующим доведением pH и объема концентрированного раствора.

Такую же процедуру применяли для получения составов от 1A до 4A и от 1B до 4B. В составах, приготовленных из основного раствора с концентрацией 3 мг/мл, использовали 13,5 мл объема, чтобы приготовить 10 мг/мл растворы, и 33,5 мл объема, чтобы приготовить 25 мг/мл растворы. В составах, в которых использовали 4,8 мг/мл основной раствор, использовали 8,4 мл объема, чтобы приготовить 10 мг/мл раствора, и 20,9 мл объема, чтобы приготовить объема, чтобы приготовить 25 мг/мл раствора.

Необходимые для конечного объема образца раствора концентрации сахарозы и аргинина добавляли в основной раствор после концентрирования раствора, а затем раствор доводили до приемлемого pH и конечного объема. ПС80 вносили в конечные образцы растворов, чтобы получить концентрацию 0,01%, используя 1% раствор ПС80.

Растворы фильтровали через 0,22 мкм шприцевой фильтр, а затем распределяли по двум флаконам. Каждый 2 мл флакон наполняли 250 л раствора и лиофилизировали, применяя следующие условия:

1. Охлаждение до -40°C при 1°C/мин.
2. Выдержка при -40°C в течение 1 ч, затем вакуумирование при 100 мторр.
3. Повышение температуры до -35°C при 0,5°C/мин и выдержка до тех пор, пока показания манометра Пирани не совпадут с показаниями емкостного манометра 100 мторр, а температура продукта не достигнет температуры полки лиофилизатора.
4. Повышение температуры до 20°C при 0,5°C/мин и выдержка до тех пор, пока показания манометра Пирани не совпадут с показаниями емкостного манометра 100 мторр, а температура продукта не достигнет температуры полки лиофилизатора.

метра Пирани не совпадут с показаниями емкостного манометра 100 мторр, а температура продукта не достигнет температуры полки лиофилизатора.

После лиофилизации фиксировали пробки и запечатывали флаконы алюминиевым колпачком. Образцы направляли на исследования в начальный момент времени (TO), а оставшиеся флаконы оставляли для исследования стабильности.

#### Модулированная дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Термическое поведение образцов растворов исследовали с помощью модулированной и стандартной ДСК. Образцы исследовали путем помещения 12 л раствора в кюветы Tzero и герметично запечатывали. Растворы охлаждали до -40°C при 1°C/мин и изотермически выдерживали в течение 5 мин. Температуру образцов повышали до 10°C при 0,5°C/мин с изменением на 1°C каждые 120 с. Некоторые образцы исследовали, проводя этап отжига. Такие образцы исследовали, охлаждая до -40°C при 1°C/мин, изотермически выдерживая в течение 5 мин, повышая температуру до -15°C или -20°C при 1-5°C/мин и изотермически выдерживая в течение по меньшей мере 60 мин. Температуру образцов снова опускали до -40°C при 5°C/мин, изотермически выдерживали в течение 5 мин и повышали при 0,5°C/мин с изменением на 1°C каждые 120 с.

#### Микроскопия лиофилизированных составов.

Образцы исследовали при помощи микроскопии лиофилизированных составов, помещая от 2 до 4 л раствора между 2 покровными стеклами на предметном столике микроскопа для лиофилизированных составов Linkam. Образец охлаждали до -40°C или ниже при 1°C/мин и изотермически выдерживали в течение 2 мин. Вакуумирование начинали при 100 микронах, а образец исследовали визуально с помощью видеокамеры, установленной на поляризационном микроскопе. Образец высушивали сублимацией при этой температуре до тех пор, пока высушенный материал не становился видимым, и фотографировали. После этого температуру образца повышали с шагом 2°C и выдерживали при каждой температуре для наблюдения высушенного сублимацией образца. Температуру образца повышали до наблюдения полного разрушения.

#### Аналитические методы.

##### А. Измерение концентрации с помощью УФ-видимой спектроскопии.

Концентрацию растворов измеряли с помощью спектрофотометра Nano Drop 2000 (Thermo Scientific). Спектры получали, размешая 2 л раствора на платформе для образцов и проводя сканирование в области 280 нм.

##### Б. pH.

pH растворов измеряли с помощью pH-измерителя Orion модели 920A. Измеритель/зонд калибровали в диапазоне от pH 7 до pH 10, используя уже готовые буферные растворы, приобретенные у Thermo Scientific.

##### С. ЭХ-ВЭЖХ.

Анализ методом эксклюзационной ВЭЖХ проводили с помощью Agilent 1100 Series HPLC. Подвижную фазу, полученную с применением 0,1 М фосфата натрия, 0,75 М гидрохлоида аргинина при pH 7,4, использовали для разделения. Применяемой аналитической колонкой была YMC-Pack diol-200, 300×4,6 мм, со средним размером частиц 5 мкм. Соответствие системы ВЭЖХ, включая колонку, проверяли с помощью шести повторных введений эталонного материала и оценивали в отношении времени удержания, площади и относительной площади главного белкового пика. Кроме того, для оценки способности колонки к разделению использовали стандарт гель-фильтрации. Образцы разводили до 1 мг/мл белка, используя буферную смесь, и вводили, чтобы получить загрузку колонки в 50 мкг белка на ввод.

##### Д. ОФ-ВЭЖХ.

Анализ методом обратно-фазовой ВЭЖХ проводили с помощью Agilent 1100 Series HPLC. В данном методе применяется градиент для разделения с использованием подвижных фаз, полученных с применением 0,1% трифторуксусной кислоты в воде для ВЭЖХ и 0,08% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Применяемой аналитической колонкой была колонка Vydac C18, 150×4,6 мм, со средним размером частиц 5 мкм. Соответствие системы ВЭЖХ, включая колонку, проверяли с помощью шести повторных введений эталонного материала и оценки времени удержания, площади и относительной площади главного белкового пика. Образцы разводили до 1 мг/мл белка, используя буферную смесь, и вводили, чтобы получить загрузку колонки в 25 мкг белка/ввод.

##### Е. ИО.

Анализ методом ионообменной ВЭЖХ проводили с помощью Agilent 1100 Series HPLC. В данном методе применяется градиент с использованием подвижных фаз, полученных с применением 20 мМ фосфата натрия при pH 6,5 и 20 мМ фосфата натрия, 1 М хлорида натрия при pH 6,5. Применяемой аналитической колонкой была Dionex Pgoras WCX-10, 250×4 мм. Соответствие системы ВЭЖХ, включая колонку, проверяли с помощью шести повторных введений эталонного материала и оценки времени удержания, площади и относительной площади для пика, помеченного как пик #2. Образцы разводили до 1 мг/мл белка, используя буферную смесь, и вводили, чтобы получить загрузку колонки в 50 мкг белка на ввод.

### Результаты.

Подгруппу образцов растворов лиофилизировали, используя консервативный цикл, и помещали в условия для исследования стабильности на 2 месяца при 25°C и 40°C. Цикл лиофилизации завершался приблизительно через 20 ч вследствие низкого объема наполнения. Все лиофилизированные лепешки оказались приемлемыми за исключением состава 2A, возможно, вследствие разрыва фильтра.

В целом, данные, полученные с помощью ЭХ и ОФ, позволили определить разницу между составами. Это позволяет предположить, что данные способы свидетельствуют о стабильности и могут быть применены для сравнения образцов. Данные подтверждают, что на стабильность г-антидота влияет pH. Данные демонстрируют, что стабильность составов, полученных при pH 7,8, лучше, чем стабильность составов, полученных при pH 8,2. В особенности это справедливо для образцов, которые хранили при 40°C.

Это исследование включает сравнение типов буферов и их влияние на стабильность г-антидота. Буферы включали трис и фосфат, полученные при pH 7,8 и 8,2. Данные позволяют предположить, что тип буфера не влияет на стабильность г-антидота, а разница в стабильности является в основном функцией pH.

Два состава в этом исследовании (составы 5 и 6) были получены без сахара и полисорбата 80. Сахарозу применяют в качестве лиопротектора, а полисорбат 80 применяют, чтобы предотвратить агрегацию белков вследствие взаимодействия со стенками флакона и взаимодействия со льдом во время этапа замораживания. Составы, приготовленные без протекторов, демонстрировали повышение процентного содержания агрегатов согласно данным ЭХ после 1 месяца хранения при 40°C. Эти данные подтверждают необходимость вспомогательных веществ в составах для улучшения стабильности белка.

Исследования стабильности также подтверждают то, что лиофилизированные образцы более стабильны, чем составы, полученные в виде растворов. Сравнение образцов растворов демонстрирует, что стабильность образцов растворов лучше в случае хранения при 5°C, чем в случае хранения при более высоких температурах.

Образцы для исследования стабильности готовили, используя объем 0,25 мл на 2 мл флакон. Разрушение наблюдали только тогда, когда было недостаточное количество твердой фазы для поддержания лепешки в образце 2A. Все остальные образцы оказались приемлемыми, однако невозможно было определить степень уменьшения объема лепешки при использовании таких малых объемов наполнения. Исследования температурных характеристик проводили одновременно с исследованиями стабильности, чтобы определить возможность лиофилизации составов в полном масштабе.

Составы 5 и 6 исследовали с помощью модулированной ДСК. Оба состава содержат приблизительно 25 мг/мл г-антидота и 95 mM аргинина HCl, но состав 5 был приготовлен с 10 mM триса, а состав 6 был приготовлен с 10 mM фосфата. Во время нагрева не наблюдали никаких тепловых явлений при наблюдении с применением полного потока тепла, нереверсивного потока тепла или реверсивного потока тепла. На термограмме полного потока тепла будут отображены как кинетические события, так и некинетические события. На термограмме нереверсивного потока тепла будут отображены кинетические события, такие как кристаллизация, а на термограмме реверсивного потока тепла будут отображены некинетические события, такие как стеклование. Отсутствие наблюдавшихся событий может свидетельствовать о том, что концентрации компонентов слишком низки, чтобы дать сигнал с достаточной интенсивностью.

Эксперименты методом микроскопии лиофилизированных составов проводили, чтобы определить, будет ли температура разрушения совпадать с результатами, наблюдаемыми для Tg', определенной с помощью МДСК. Ождалось, что термическое поведение всех образцов будет сходным, так как все они содержали одинаковые вспомогательные вещества в сходных концентрациях.

Составы 5 и 6 были приготовлены с концентрацией г-антидота, составляющей приблизительно 25 мг/мл, и оба содержали 95 mM аргинина при pH 7,8. Единственным различием между составами был буфер. Состав 5 содержал 10 mM триса, а состав 6 содержал 10 mM фосфата. Состав 5 демонстрировал разрушение при -40°C, а состав 6 демонстрировал разрушение при -39°C. Данные подтверждают то, что температуру продукта следует поддерживать ниже определенной температуры разрушения, чтобы получить приемлемые лиофилизированные образцы. Поддержание таких низких температур продукта невозможно в лаборатории или полномасштабных лиофилизаторах.

Хотя данные по стабильности лиофилизированных составов оказались приемлемыми, данные тепловых характеристик продемонстрировали, что состав не подходил для масштабирования из-за низкой температуры разрушения. Тепловые характеристики, полученные с помощью МДСК и микроскопии лиофилизированных составов, позволяют предположить, что после замораживания и сушки составы остаются аморфными, а комбинация компонентов приводит в низкой температуре разрушения. Единственным способом создать состав, который подходит для масштабирования, является добавление кристаллизующего компонента, чтобы он служил каркасом, который может удерживать аморфный материал на месте во время и после сублимационной сушки. Наиболее применяемым кристаллизующим компонентом, добавляемым в фармацевтические составы, является маннит. Во время всей последующей работы по разработке состава и процесса исследовали добавление маннита в разных концентрациях. Разработка состава, содержащего маннит, и исследования стабильности для этих составов описаны в отдельном от-

чете о разработке.

#### Заключение.

Влияние типа буфера, pH, стабилизатора и концентрации белка на стабильность г-антидота исследовали для раствора и лиофилизованных составов. Образцы растворов хранили при 5°C и 25°C до 2 недель, а лиофилизованные образцы хранили при 25°C и 40°C до 2 месяцев. Составы, лиофилизованные в объеме 0,25 мл в 2 мл флаконах, демонстрировали приемлемую стабильность через 2 месяца. Однако эксперименты по определению тепловых характеристик продемонстрировали, что все образцы имели температуры разрушения -37°C или ниже и не подходили для масштабирования. Эти данные позволяют предположить, что в составе необходим кристаллизующий компонент для предотвращения разрушения и для возможности лиофилизации при более высоких температурах.

Пример 7. Влияние типа буфера и маннита на термическое поведение и стабильность состава.

Данные примера 6 дают основание предположить, что в составе г-антидота необходим кристаллизующий компонент для предотвращения разрушения во время сублимационной сушки. В этом примере исследовали влияние разных концентраций маннита и аргинина на термическое поведение и внешний вид лиофилизированной лепешки составов. Составы, содержащие от 2% до 4% маннита, исследовали в комплексе со снижением концентрации аргинина. Аргинин предотвращал кристаллизацию маннита, если его концентрация не составляла 47,5 mM или менее. Исследования показали, что состав, содержащий 10 mM триса, 10 мг/мл г-антидота, 45 mM аргинина, 2% сахарозы, 5% маннита и 0,01% полисорбата 80, давал лиофилизированные лепешки с приемлемым внешним видом, а также физической и химической стабильностью. Исследования лиофилизации позволили получить данные в пользу применения температуры полки лиофилизатора при первичной сушке -25°C после отжига при -25°C в течение 3 ч. Двухэтапный процесс вторичной сушки приводил к получению лепешек со значением остаточной влажности менее 1%.

#### Дизайн эксперимента/исследования.

Эксперименты были поставлены так, чтобы одновременно исследовать термическое поведение составов и сравнивать химическую стабильность составов, которые были лиофилизированы с использованием консервативного цикла. Исходные составы готовили с 95 mM аргинина, 2% сахарозы, 2% маннита и 10 mM триса или 10 mM фосфатных буферов при pH 7,8. Составы также содержали активный ингредиент в концентрации 10 или 25 мг/мл (табл. 8.1).

Таблица 8.1. Исходные составы, приготовленные с маннитом при pH 7,8

| Обозначение состава | Аргинин (мМ) | Три с | Фосфат (мМ) | Сахароза (%) | Маннит (%) | г-антидот (мг/мл) |
|---------------------|--------------|-------|-------------|--------------|------------|-------------------|
| TM1                 | 95           | 10    |             | 2            | 2          | 10                |
| TM2                 | 95           | 10    |             | 2            | 2          | 25                |
| PM1                 | 95           |       | 10          | 2            | 2          | 10                |
| PM2                 | 95           |       | 10          | 2            | 2          | 25                |

Аликовты размороженного лекарственного состава помещали в кассеты для диализа с мембранными отсечением по молекулярной массе (ОММ) 3К. Кассеты помещали в буферные растворы, содержащие триса или фосфат с аргинином, сахарозой и маннитом. Каждую кассету, содержащую раствор лекарственного состава помещали в 2 л буферного раствора и проводили диализ в течение 4 ч. Через 2 ч буферный раствор заменяли свежим и проводили диализ растворов еще в течение 4 ч или в течение ночи при 2-8°C. Растворы удаляли из кассет для диализа с помощью шприцов BD с иглами 18G и помещали в пробирки для фильтрации на центрифуге с мембранными ОММ 3К. Пробирки центрифугировали приблизительно при 3000 об/мин в течение 20-30 мин, а концентрацию растворов проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000. Растворы концентрировали до более чем 10 мг/мл или 25 мг/мл и разводили до приемлемой концентрации подходящим буферным раствором, а концентрацию полисорбата доводили до 0,01% с помощью 1% раствора полисорбата 80. Растворы фильтровали через 0,22 мкм шприцевые фильтры и заливали в 3 мл стеклянные трубчатые флаконы в объеме 0,2 5 мл и 0,8 мл на флакон. Растворы высушивали сублимацией, применяя консервативный цикл (табл. 8.2) и оставляли для исследования стабильности при 25°C и 40°C на срок до 2 месяцев.

Таблица 8.2. Консервативный цикл лиофилизации, применяемый для содержащих маннит составов

| Этап            | Подробности  |
|-----------------|--|
| Замораживание   | Снижение температуры при 1 °C/мин до -40 °C  |
| Изотермический  | Выдержка 120 мин   |
| Отжиг           | Повышение температуры при 1 °C/мин до -25 °C, выдержка 180 мин                     |
| Первичная сушка | -30 °C, выдержка до тех пор, пока Пирани=EM  |
| Вторичная сушка | Повышение температуры при 0,5 °C/мин до 40 °C, выдержка до тех пор, пока Пирани=EM |

Перед сублимационной сушкой образцы каждого раствора отбирали для проведения термоанализа методами ДСК и МЛП.

Проведение дополнительного термоанализа и исследований по разработке цикла лиофилизации за-

вершали с буферными растворами, приготовленными без белка. Проводили эксперименты, чтобы определить минимальную концентрацию аргинина, необходимую для солюбилизации белка в растворе, но не препятствующую кристаллизации маннита. Исследования растворимости проводились клиентом, чтобы определить минимальную концентрацию аргинина, необходимую для солюбилизации белка. Эксперименты проводились Baxter, чтобы исследовать влияние концентрации аргинина и маннита на термическое поведение, условия лиофилизационного цикла и внешний вид лепешки. Буферные растворы содержали 10 mM триплекс с 2% сахарозы при pH 7,8. Концентрация аргинина варьировалась от 95 до 9,5 mM, а концентрация маннита варьировалась между 2 и 5%.

Приемлемые кандидатные составы определяли на основании термического поведения, внешнего вида лепешки и данных кратковременных испытаний на стабильность. Предложенный для дальнейшей разработки состав содержит 10-25 мг/мл г-антидота, 10 mM триплекс при pH 7,8, 45 mM аргинина, 2% сахарозы, 5% маннита и 0,01% полисорбата 80. В более ранних исследованиях использовали от 0,2 мл до 1 мл на 3 мл флакон. Начальные исследования стабильности с использованием состава с низким содержанием аргинина проводили при концентрации лекарственного состава 25 мг/мл, а лиофилизацию проводили, применяя консервативный цикл. Образцы оставляли для исследования стабильности при 25°C и 40°C на срок до 3 месяцев.

В проводимых для подтверждения процесса циклах использовали раствор лекарственного состава, налитый в 10 мл флаконы в объеме 5 мл на флакон. Такие же флаконы и объем наполнения применяли для исследования влияния содержания влаги во время исследований вторичной сушки. Составы для этих исследований готовили, используя раствор лекарственного состава, в котором производили замену на подходящий буфер с помощью устройства для тангенциальной потоковой фильтрации (ТПФ) лабораторного масштаба. Устройство для ТПФ было оборудовано емкостью для выдержки раствора, которая была соединена с тангенциальным потоковым фильтром с помощью системы трубок. Емкость заполняли раствором лекарственного состава, проводили замену на подходящий буфер и концентрировали до 10-25 мг/мл путем фильтрации через мембрану с ОММ 10 кДа. Добавляли достаточное количество 1% полисорбата 80 (ПС80), чтобы получить концентрацию ПС80 0,01%. Конечный раствор фильтровали через 0,22 мкм шприцевой фильтр или систему для вакуумной фильтрации.

Проводя циклы лиофилизации, исследовали рабочие параметры, такие как скорость снижения температуры и скорость повышения температуры между первичной и вторичной сушкой, а также температура полки лиофилизатора во время отжига и первичной сушки. Проводили исследование остаточной влажности путем отбора образцов в начале процесса вторичной сушки и через 4, 8 и 10 ч при 40°C. Второе исследование проводили путем отбора образцов через 8 ч при 40°C и через 1 и 2 ч при 50°C. Образцы исследовали в отношении остаточной влажности методом Карла Фишера, а сушку считали завершенной, когда значение остаточной влажности выходило на плато. Исследовали влияние остаточной влажности на стабильность состава путем отбора образцов в моменты времени в процессе вторичной сушки, которые соответствовали определенным значениям остаточной влажности. Образцы помещали для исследования стабильности при 40°C на срок до 2 месяцев и при 50°C на 1 неделю.

Проектное поле цикла лиофилизации создавали для предложенного состава лекарственного продукта, содержащего 10 мг/мл г-антидота, 10 mM триплекс, 45 mM аргинина, 2% сахарозы, 5% маннита и 0,01% полисорбата 80 при pH 7,8. Растворы заливали в 10 мл стеклянные трубчатые флаконы в объеме 5 мл на флакон. Разработка проектного поля требует знания технической оснащенности вместе с температурой разрушения состава и коэффициентом теплопередачи флакона. Коэффициент теплопередачи флакона определяли, используя стеклянный трубчатый флакон, применяемый для продукта, наполняя флакон водой и сублимируя лед при температуре полки лиофилизатора, предназначенный для сушки продукта. Данные по температуре продукта и потоку массы получали, варьируя давление в камере от приблизительно 25 мторр до приблизительно 4 00 мторр. Данные по потоку массы получали при каждом значении давления с помощью абсорбционной спектроскопии с перестраиваемым диодным лазером (TDLAS), а изменение скорости потока массы в зависимости от давления использовали для расчета коэффициента теплопередачи флакона.

#### Результаты.

##### 1. Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК).

Готовили отдельные растворы каждого буферного компонента и исследовали с помощью ДСК, чтобы определить влияние каждого компонента на термическое поведение буферного состава. Как правило, термическое поведение состава обусловлено компонентом, присутствующим в наибольшей концентрации. Изменения в термическом поведении могут возникать при добавлении в лекарственный состав других вспомогательных веществ. Например, добавление солей может снижать Tg' аморфных материалов в растворе. Предложенный лекарственный состав содержит маннит. Маннит добавляют в качестве вспомогательного вещества в лиофилизированные составы, чтобы он служил кристаллизующим объемообразующим агентом. При первичном замораживании маннит в растворе аморфен. Как правило, в процесс замораживания включен этап отжига, чтобы стимулировать кристаллизацию маннита так, чтобы он мог обеспечивать структуру лепешки. Другие вспомогательные вещества и/или активный ингредиент в составе могут предотвращать или замедлять кристаллизацию маннита. В обсуждаемых в этом разделе ис-

следованиях изучали влияние трил, фосфата и аргинина на кристаллизацию маннита и термическое поведение раствора.

10 mM раствор трил, полученный при pH 7,8, охлаждали при 1°C/мин до -50°C (фиг. 2), применяя ДСК. Термограмма демонстрирует кристаллизационную экзотерму для льда, начиная приблизительно с -20°C, за которой следует кристаллизационная экзотерма трил при -32°C.

При внесении в состав 95 mM аргинина кристаллизационная экзотерма исчезает (фиг. 3). В данном температурном диапазоне в этом исследовании не наблюдали более никаких тепловых явлений кроме эндотермы плавления для льда.

Tg' со средней точкой приблизительно -42°C наблюдают, когда состав с 10 mM трил, 95 mM аргинина содержит 4% сахарозы. Средняя точка Tg' для одной сахарозы, как правило, соответствует -33°C. Исследование демонстрирует, что смесь трил/аргинин снижает Tg' сахарозы. Раствор с Tg' ниже -40°C не является приемлемым кандидатом для лиофилизации. Трудно поддерживать такую низкую температуру продукта во время первичной сушки. Добавление кристаллизующего компонента, такого как маннит, может обеспечить структуру и улучшить шансы успешной лиофилизации, так как маннит кристаллизуется до начала первичной сушки.

Маннит добавляли в состав при 2% мас./об., а концентрацию сахарозы снижали до 2% так, чтобы поддерживать общее содержание сахара в составе на уровне 4%. Раствор, приготовленный с 10 mM трил, 2% сахарозы и 2% маннита, демонстрирует, что маннит начинает кристаллизоваться приблизительно при -20°C (фиг. 4). Кристаллизация маннита прекращалась при добавлении в раствор 95 mM аргинина (фиг. 5). Маннит не кристаллизовался даже, когда замороженный раствор отжигали при -20°C до 5 ч (фиг. 6).

Такой же термоанализ проводили для растворов, приготовленных с 10 mM фосфата натрия, чтобы исследовать влияние буфера на термическое поведение состава. Фосфат натрия кристаллизовался во время этапа охлаждения (фиг. 7) в виде 10 mM раствора при pH 7,8.

Смесь 10 mM фосфата натрия с 95 mM аргинина и 4% сахарозы демонстрирует Tg' со средней точкой приблизительно при -38°C.

Аналогично с растворами трил, фосфатные растворы, содержащие сахарозу и маннит, демонстрируют кристаллизационную экзотерму маннита (фиг. 8). Кристаллизационная изотерма отсутствует при добавлении в смесь 95 mM аргинина (фиг. 9). Аналогично с составом, приготовленным с трил, кристаллизационную экзотерму маннита не наблюдали даже, когда фосфатный состав отжигали при -20°C в течение 5 ч.

Исследования демонстрируют, что добавление 95 mM аргинина в составы, содержащие трил или фосфат, резко снижает Tg' для сахарозы и препятствует кристаллизации маннита. Данные продемонстрировали, что внесение изменений в состав необходимо, чтобы стимулировать кристаллизацию маннита для получения приемлемой лиофилизационной лепешки. Данные, полученные во время исследования, давали основание предположить, что для поддержания растворимости белка необходимы 95 mM аргинина или от 10 mM до 20 mM цитрата. Следовательно, проводили исследования с применением растворов, содержащих 10 mM или 20 mM цитрата в 10 mM трил с 2% сахарозы и 5% маннита, в качестве альтернативы аргинину в составе. Концентрацию маннита увеличивали, а концентрацию сахарозы уменьшали, чтобы повысить вероятность кристаллизации маннита. Исследования с применением 2% сахарозы с 5% маннита вместе с аргинином описаны далее в этом отчете.

Растворы, содержащие цитрат, отжигали при -25°C. Кристаллизационную экзотерму с началом в 24 мин наблюдали в 10 mM цитрата при -25°C (фиг. 10) и с началом в 30 мин в 20 mM цитрата при -25°C (фиг. 11).

## 2. Микроскопия лиофилизованных составов (МЛП).

Составы, приготовленные с 10 mM фосфата или 10 mM трил с 10 мг/мл г-антидота, 95 mM аргинина, 2% сахарозы и 2% маннита при pH 7,8, исследовали с помощью МЛП. Эксперименты, проводимые с трил-составом, демонстрировали начало разрушения состава приблизительно при -34°C в случае отжига при -25°C до 3 ч.

Состав, содержащий 10 mM фосфата, имел более высокую температуру разрушения. Плотный сухой слой наблюдали при -32°C, а начало разрушения наблюдали при -30°C.

Данные МЛП дают основание предположить, что оба состава можно лиофилизировать в условиях, применяемых для обычного производства. Это не коррелирует с данными, полученными методом ДСК. В экспериментах, проводимых с помощью МЛП, использовали тонкие слои раствора между двумя покровными стеклами, находящимися в прямом контакте с температурно-регулируемым предметным столиком. Эти условия предполагают легкую сушку и, следовательно, не могут коррелировать с данными ДСК, которые требовали проведения последующих исследований с учетом их релевантности.

## 3. Лиофилизация и стабильность.

Содержащие фосфат и трил составы, приготовленные с 10 мг/мл и 25 мг/мл г-антидота, с 95 mM аргинина, 2% сахарозы и 2% маннита при pH 7,8, исследовали в отношении стабильности в виде растворов и лиофилизованных образцов. Каждый раствор наливали в 3 мл флаконы в объеме 0,20 мл на флакон. Часть образцов хранили при 5°C и 25°C до 2 недель, а другую часть образцов лиофилизовали с помощью консервативного цикла и оставляли для исследования стабильности при 25°C на срок до 3 месяцев и

при 40°C на срок до 2 месяцев.

Образцы отжигали при -25°C в течение 1 ч перед лиофилизацией при -30°C. Вторичную сушку проводили, также используя стандартные условия с температурой полки лиофилизатора 20°C. Консервативный нетрадиционный цикл применяли потому, что было мало известно о температурной чувствительности белка. Цикл лиофилизации завершали приблизительно в течение 21 ч. Флаконы закрывали пробками перед изъятием из лиофилизатора, запечатывали алюминиевыми колпачками и оставляли для исследования стабильности.

Лиофилизированные лепешки имели приемлемый внешний вид без признаков разрушения и быстро восстанавливались в очищенной воде. Одновременно проводили второе исследование с теми же самыми составами без лекарственного средства, чтобы убедиться в том, что кристаллизация маннита в случае, если она имеет место, не приводит к разрушению флаконов. Плацебо-составы наливали в 20 мл флаконы с 10 мл раствора в каждом. Один полный планшет флаконов охлаждали до -40°C при 1°C/мин, изотермически выдерживали в течение 120 мин, а затем повышали температуру до -25°C при 1°C/мин в течение 3 ч отжига. Второй планшет флаконов охлаждали до -25 °C, изотермически выдерживали в течение 3 ч, охлаждали до -35°C, а затем переносили в сушилку, содержащую полный планшет флаконов. Все флаконы лиофилизировали при -30°C и высушивали при 25°C во время вторичной сушки. Разрушение наблюдали во флаконах, содержащих оба состава.

Это дает основание предположить, что маннит не кристаллизуется, и подтверждает вывод, сделанный во время термоанализа методом ДСК, о том, что аргинин препятствует кристаллизации маннита. Следовательно, данные ДСК и лиофилизации, учитывая их, а не результатов МЛП, релевантность в отношении разработки состава, требовали проведения дополнительных экспериментов.

Описанные в следующем примере исследования сфокусированы на снижении количества аргинина и его влиянии на растворимость белка и кристаллизацию маннита. Описанные выше содержащие фосфат и трикс составы, приготовленные с 95 mM аргинина, оставили для исследований стабильности, чтобы обеспечить исходные данные.

Для образцов растворов, хранимых при 5°C и 25°C до 2 недель, не наблюдали никакого снижения концентрации, и также не было разницы в концентрации между жидкими и лиофилизованными образцами при ТО (фиг. 12 и 13).

Аналогично, в любом из лиофилизованных составов, хранимых при 25°C до 3 месяцев (фиг. 14) или 40°C до 2 месяцев, не наблюдали никакого снижения концентрации.

Данные ЭХ показывают отсутствие уменьшения основного пика в случае хранения составов растворов при 5°C до 2 недель. Основной пик уменьшился в процентном отношении более чем на 1% в 10 мг/мл образцах и более чем на 3% в 25 мг/мл при хранении при 25°C до 2 недель.

Следовательно, хотя химическая стабильность растворов оказалась приемлемой, изменения состава были необходимы из-за плохой физической стабильности во время лиофилизации. Плохая физическая стабильность проявлялась в виде разрушения лепешек, наблюдаемого для плацебо-состава. Данные экспериментов ДСК дают основание предположить, что уменьшение концентрации аргинина и повышение концентрации маннита должно стимулировать кристаллизацию маннита и улучшить физическую стабильность лиофилизированной лепешки.

Пример 8. Влияние концентрации аргинина и маннита на термическое поведение и внешний вид лиофилизованных образцов.

Этот эксперимент проводили, применяя плацебо-составы, чтобы исследовать влияние концентрации аргинина и концентрации маннита на термическое поведение и внешний вид лепешки. Исследования были сфокусированы на плацебо-составах, приготовленных с трикс-буфером. Трикс-буфер был выбран потому, что он является буфером, применяемым для приготовления общего объема раствора лекарственного состава, и потому, что не было разницы в химической стабильности образцов, приготовленных с трикс и фосфатом натрия.

Следующие исследования проводили с аргинином в концентрации в диапазоне от 9,5 до 95 mM и маннитом в концентрации в диапазоне от 2 до 5%.

#### 1. Термоанализ.

Целью термоаналитических экспериментов было определение концентраций аргинина и маннита, которые стимулируют кристаллизацию маннита, без существенного повышения концентрации твердофазного материала в составе. Высокие концентрации твердофазного материала могут повышать сопротивляемость переносу массы во время лиофилизации и приводить к слишком длинным циклам лиофилизации.

В составе, содержащем 10 mM трикс, 2% сахарозы, 2% маннита и 0,01% ПС80, снижали концентрацию аргинина, при этом концентрация маннита оставалась постоянной. Составы отжигали при температуре от -15°C до -25°C до 5 ч, чтобы стимулировать кристаллизацию. Кристаллизацию маннита наблюдали только тогда, когда концентрация аргинина была снижена до 9,5 mM, а температура отжига составляла -22°C или более. Кристаллизация маннита начиналась в начале процесса отжига при -22°C (фиг. 15).

Начало кристаллизации маннита происходило через 30 мин после отжига при -25°C, когда его концентрацию повышали до 4%, а концентрацию аргинина снижали от 95 mM до 47,5 mM (фиг. 16). Иссле-

давали более низкие температуры отжига, так как при отжиге при более высоких температурах наблюдали изменения внешнего вида лиофилизованных лепешек. Изменения внешнего вида включали усадку лепешек при проведении отжига при  $-15^{\circ}\text{C}$ .

Когда концентрация аргинина превышала 47,5 mM, происходило замедление или предотвращение кристаллизации маннита, чья концентрация в составе составляла 2%. Максимальная концентрация аргинина, которая может быть включена в состав и не оказывать негативное влияние на кристаллизацию маннита, составляет 47,5 mM. Это предположение было подтверждено экспериментами по лиофилизации, которые проводили с плацебо-составом с 2% маннита и 47,5 mM, 71 mM или 85,5 mM аргинина. Образцы, приготовленные с 47,5 mM аргинина, были фармацевтически приемлемыми, а образцы, приготовленные с большим количеством аргинина, демонстрировали разрушение. Повышение концентрации маннита может повысить вероятность кристаллизации. Отжиг замороженного раствора необходим, чтобы стимулировать кристаллизацию при повышении концентрации маннита до 4% и 5%, когда концентрация аргинина превышает 47,5 mM.

Маннит легко кристаллизуется в составах, содержащих 5% маннита и 47,5 mM аргинина. Состав, содержащий 10 mM трис, 47,5 mM аргинина, 2% сахарозы, 5% маннита и 0,01% ПС80, медленно охлаждали до  $-40^{\circ}\text{C}$  при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (фиг. 17). Кристаллизационную экзотерму маннита наблюдали во время этапа охлаждения, когда состав охлаждали при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Образец состава быстро охлаждали (охлаждали быстрее, чем  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до  $-40^{\circ}\text{C}$ , а затем отжигали при  $-25^{\circ}\text{C}$  (фиг. 18). Маннит кристаллизовался через 23 мин, когда раствор отжигали при  $-25^{\circ}\text{C}$ . Эти эксперименты демонстрируют, что маннит будет легко кристаллизоваться в составе, пока концентрация аргинина составляет менее 47,5 mM.

Данные термоанализа подтверждают то, что маннит в концентрации 4% или более будет легко кристаллизоваться в приемлемых временных рамках во время процесса лиофилизации, если концентрация аргинина составляет 47,5 mM или менее.

## 2. Лиофилизация.

Исследования лиофилизации проводили одновременно с термоаналитическими экспериментами. Растворы плацебо готовили с 10 mM трис, от 9,5 mM до 23,75 mM аргинина, 2% сахарозы и от 2% до 4% маннита или 10 mM трис с 47,5 mM аргинина с или без 4% сахарозы. Также был включен состав, содержащий 10 mM трис, 47,5 mM аргинина, 2% сахарозы и 5% маннита. Растворы наливали в 20 мл флаконы в объеме 3 мл раствора на флакон. Чтобы определить, можно ли получить приемлемые лепешки, использовали консервативный нетрадиционный цикл лиофилизации. Образцы охлаждали до  $-20^{\circ}\text{C}$  при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , отжигали в течение 3 ч, охлаждали до  $-40^{\circ}\text{C}$  при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и выдерживали до 2 ч. Вакуумирование начинали при 100 мторр, а температуру полки лиофилизатора повышали до  $-30^{\circ}\text{C}$  при  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Образцы выдерживали при  $-30^{\circ}\text{C}$  до тех пор, пока показания манометра Пирани не совпадали с показаниями емкостного манометра (ЕМ), а затем температуру поднимали до температуры вторичной сушки  $25^{\circ}\text{C}$  при  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Вторичная сушка завершалась, когда показания манометра Пирани совпадали с показаниями емкостного манометра. Первичная сушка завершалась приблизительно через 30 ч, а вторичная сушка требовала только пары часов.

Образцы, приготовленные с трис и одним аргинином, демонстрировали полное разрушение, а образцы, содержащие 4% сахарозы, демонстрировали усадку лепешек.

Все образцы, содержащие 47,5 mM аргинина или менее и от 2% до 5% маннита, характеризовались приемлемыми лепешками.

Были включены исследования для изучения влияния отжига во время охлаждения при объеме наполнения 10 мл. В этих исследованиях использовали образцы, приготовленные с 10 mM трис, 2% сахарозы, с 23,75 и 47,5 mM аргинина и от 2 до 5% маннита. Раствор охлаждали при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$ , выдерживали в течение 3 ч, начинали вакуумирование при 100 мторр, а температуру полки лиофилизатора повышали до  $-20^{\circ}\text{C}$  при  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Образцы высушивали при  $-20^{\circ}\text{C}$ , а полку лиофилизатора нагревали до  $25^{\circ}\text{C}$  для вторичной сушки. Все образцы выглядели приемлемо без признаков разрушения.

Те же самые составы использовали, чтобы исследовать влияние скорости охлаждения на внешний вид лиофилизованных лепешек. Одну группу образцов охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$  при  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и отжигали в течение 3 ч. Вторую группу образцов охлаждали до  $-25^{\circ}\text{C}$  при  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  и отжигали в течение 3 ч. Группы образцов смешивали в одной сушилке и лиофилизировали при  $-30^{\circ}\text{C}$  в случае первичной сушки, за которой следовала вторичная сушка при  $25^{\circ}\text{C}$ .

Все образцы выглядели приемлемо без признаков разрушения. Данные подтверждают то, что скорость охлаждения от  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  не оказывает отрицательное влияние на внешний вид образцов.

Проводимые клиентом исследования растворимости подтвердили, что белок остается растворимым в растворе, если концентрация аргинина составляет 36 mM или более в диапазоне pH от 7,5 до 8,2. Было решено использовать раствор, который содержал 45 mM аргинина, так как он гарантировал бы полную растворимость белка и в то же время его концентрация не превышает концентрацию, которая предотвращала бы кристаллизацию маннита. Выбранная концентрация маннита составляла 5%, чтобы гарантировать, что он будет легко кристаллизоваться во время цикла. Таким образом, наилучший кандидатный состав представлял собой 10 mM трис, 10 mg/ml или 25 mg/ml г-антидота, 45 mM аргинина, 2% сахарозы,

5% маннита с 0,01% ПС80, полученный при pH 7,8.

Исследования лиофилизации, проведенные с плацебо-растворами, продемонстрировали, что приемлемые лепешки можно было получать, когда концентрация аргинина составляла 47,5 мМ или менее с 2% маннита или более. Растворы лиофилизировали при значении температуры полки лиофилизатора -20°C с отсутствием признаков разрушения. Образцы отжигали при -20°C в течение 3 ч во время этапа охлаждения или после этапа замораживания при -40°C без какого-либо влияния на внешний вид лепешек. Сначала применяли консервативный традиционный подход для замораживания образцов при -40°C, за которым следовал этап отжига с первичной сушкой. Такой подход был выбран для цикла лиофилизации. Первичную сушку проводили после этапа отжига при -20°C с последующим повышением температуры полки лиофилизатора при 0,5°C/мин до 25°C для вторичной сушки. Последующие исследования по разработке процесса лиофилизации были сфокусированы на приемлемой температуре полки лиофилизатора и продолжительности вторичной сушки.

Цели разработки лиофилизированного состава включали

- (1) концентрацию белка, составляющую по меньшей мере 10 мг/мл;
- (2) улучшение стабильности при 2-8°C; (3) время восстановления ≤5 мин; и (4) надежный процесс лиофилизации.

Проводили несколько этапов отбора состава, чтобы оценить влияние отдельных переменных на стабильность белка (как в виде лиофилизированной лепешки, так и в растворе) и растворимость белка при 5°C. Во время отбора состава применяли консервативный цикл лиофилизации. Разработку процесса лиофилизации проводили параллельно.

Исследования продемонстрировали, что в терминах концентрации растворы с более высокой концентрацией (например, 25 мг/мл) были менее стабильны, чем растворы с более низкой концентрацией (например, 10 мг/мл) через 2 дня при комнатной температуре (т.е. наблюдали большее увеличение общего количества агрегатов методом ЭХ и % бета-пика методом ОФ-ВЭЖХ). Подтвердили, что оптимальным pH для стабильности г-антидота (лиофилизированного продукта и в растворе) является pH 7,80±0,3.

Никакой существенной разницы в стабильности между трис-буфером и фосфатным буфером в присутствии других стабилизирующих компонентов (т.е. сахарозы и аргинина) не наблюдали.

В терминах типа и концентрации стабилизатора, как 2%, так и 4% мас./мас. сахарозы обеспечивали хороший стабилизирующий эффект. Для сохранения растворимости г-антидота при ≥50 мг/мл при 5°C, pH 7,80±0,3, требуется концентрация аргинина ≥36 мМ.

Кристаллический компонент (объемообразующий агент) маннит в концентрации ≥4% мас./мас. (в присутствии 10 мМ трис, 2% мас./мас. сахарозы, 45 мМ аргинина) был важен для того, чтобы избежать разрушения во время первичной сушки. Кроме того, наличие небольшого количества полисорбата 80 важно для того, чтобы гарантировать стабильность г-антидота в растворе в условиях сдвигового напряжения (встряхивание при комнатной температуре).

Приведенная ниже композиция является примером подходящего раствора для лиофилизации.

Таблица 8.3. Композиция г-антидота для инъекции 50 мг/флакон

| Ингредиенты                    | Функция                                       | Количество на единицу      | Концентрация после восстановления |
|--------------------------------|---|----------------------------|-----------------------------------|
| г-антидот                      | Активный ингредиент                           | 50 мг                      | 10 мг/мл                          |
| Трис (Трометамин)              | Буфер   | 6,1 мг                     | 10 мМ                             |
| Сахароза                       | Стабилизатор                                  | 100 мг                     | 2%                                |
| Маннит                         | Объемообразующий агент                        | 250 мг                     | 5%                                |
| L-аргинина гидрохлорид         | Стабилизатор                                  | 47,4 мг                    | 45 мМ                             |
| Хлористоводородная кислота     | Для доведения pH                              | от QS до pH 7,80 ± 0,1     |                                   |
| Полисорбат 80                  | Поверхностно-активное вещество и стабилизатор | 0,5 мг                     | 0,01% мас./об.                    |
| Вода для инъекций <sup>1</sup> | Носитель                                      | от QS до 5 мл <sup>1</sup> |                                   |
| pH                             |   |                            | 7,8                               |

<sup>1</sup> Удаляется во время лиофилизации.

<sup>2</sup> Для восстановления 4,70 мл стерильной воды для инъекций (СВДИ).

Лиофилизированный состав улучшает стабильность лекарственного продукта г-антидота и может храниться при 2-8°C. В следующей таблице сравниваются композиции замороженного жидкого лекарственного продукта и восстановленного лиофилизированного лекарственного продукта. Представлены

примеры композиции 100 мг/флакон и 400 мг/флакон лиофилизированного лекарственного продукта и пример восстановленных композиций.

Таблица 8.4. Состав замороженного жидкого лекарственного продукта г-антидота для инъекций, 3 мг/мл

| Ингредиенты                            | Количество на флакон | Количество (мг/мл)          |
|--|----------------------|-----------------------------|
| г-антидот                              | 30 мг                | 3 мг/мл                     |
| Трис                                   | 12,1 мг              | 1,21 мг/мл (10 мМ)          |
| L-аргинина гидрохлорид                 | 200 мг               | 20,0 мг/мл (95 мМ)          |
| Сахароза                               | 400 мг               | 40,0 мг/мл (4% мас./мас.)   |
| Полисорбат 80                          | 1,0 мг               | 0,1 мг/мл (0,01% мас./мас.) |
| Вода для инъекций                      | От QS до 10 г        |                             |
| Раствор хлористоводородной кислоты, 1N | От QS до pH=7,8      |                             |
| Раствор гидроксида натрия, 1N          | От QS до pH=7,8      |                             |
| pH                                     | 7,8 ± 0,3            | 7,8 ± 0,3                   |

Таблица 8.5. Состав лиофилизированного лекарственного продукта г-антидота для инъекций, 50 мг/флакон

| Ингредиенты                  | Количество на флакон                                    | Количество (мг/мл) после восстановления |
|------------------------------|---|---|
| г-антидот                    | 50 мг   | 10 мг/мл                                |
| Трис                         | 6,1 мг  | 1,22 мг/мл (10 мМ)                      |
| L-аргинина гидрохлорид       | 47,4 мг   | 9,48 мг/мл (45 мМ)                      |
| Сахароза                     | 100 мг  | 20 мг/мл (2% мас./мас.)                 |
| Маннит                       | 250 мг  | 50 мг/мл (5% мас./мас.)                 |
| Полисорбат 80                | 0,5 мг  | 0,1 мг/мл (0,01% мас./мас.)             |
| Стерильная вода для инъекций | От QS до 5 мл, удаляется во время процесса лиофилизации |   |
| Хлористоводородная кислота   | От QS до pH=7,8   |   |
| pH                           | 7,8 ± 0,3   | 7,8 ± 0,3                               |

Таблица 8.6. Состав лиофилизированного лекарственного продукта г-антидота для инъекций, 100 мг/флакон

| Ингредиенты                  | Количество на флакон                                     | Количество (мг/мл) после восстановления |
|------------------------------|--|---|
| г-антидот                    | 100 мг   | 10 мг/мл                                |
| Трис                         | 12,1 мг  | 1,22 мг/мл (10 мМ)                      |
| L-аргинина гидрохлорид       | 94,8 мг  | 9,48 мг/мл (45 мМ)                      |
| Сахароза                     | 200 мг   | 20 мг/мл (2% мас./об.)                  |
| Маннит                       | 500 мг   | 50 мг/мл (5% мас./об.)                  |
| Полисорбат 80                | 1,0 мг   | 0,1 мг/мл (0,01% мас./об.)              |
| Стерильная вода для инъекций | От QS до 10 мл, удаляется во время процесса лиофилизации |   |
| Хлористоводородная кислота   | От QS до pH=7,8  |   |
| pH                           | 7,8 ± 0,3  | 7,8 ± 0,3                               |

Таблица 8.7. Состав лиофилизированного лекарственного продукта г-антидота для инъекций, 400 мг/флакон

| Ингредиенты                  | Количество на флакон                                     | Количество (мг/мл) после восстановления (всего 40 мл) |
|------------------------------|--|---|
| г-антидот                    | 400 мг   | 10 мг/мл  |
| Трис                         | 12,1 мг  | 0,30 мг/мл (2,5 мМ)                                   |
| Трис HCl                     | 15,8 мг  | 0,39 мг/мл (2,5 мМ)                                   |
| L-аргинина гидрохлорид       | 189,6 мг   | 4,7 мг/мл (22,5 мМ)                                   |
| Сахароза                     | 400 мг   | 10 мг/мл (1% мас./об.)                                |
| Маннит                       | 1000 мг  | 25 мг/мл (2,5% мас./об.)                              |
| Полисорбат 80                | 2,0 мг   | 0,1 мг/мл (0,01% мас./об.)                            |
| Стерильная вода для инъекций | От QS до 20 мл, удаляется во время процесса лиофилизации |   |
| pH                           | 7,8 ± 0,3  | 7,8 ± 0,3   |

Микроскопию лиофилизированных составов применяли к двум разным составам. Приблизительно 0,15 мл раствора помещали в стеклянную ячейку, которую подвергали сублимационной сушке с регулируемой температурой. На дне и в центре ячейки помещали термопары, чтобы следить за температурой образца. Жидкость охлаждали при скорости 0,5°C/мин до -50°C, отжигали при -20°C в течение 1 ч и повторно замораживали при -50°C. Ячейку изымали и нагревали при скорости 0,5°C/мин. Учитывая эту температуру разрушения, комбинации температур и давлений в процессе сублимационной сушки, которые приводят к температурам продукта ниже температуры разрушения, приведут к образованию лепешки без разрушения. Например, для получения лепешки без разрушения можно использовать температуры продукта до 20°C с давлением 100 мторр.

| Состав   | Температура разрушения (°C) |
|--|-----------------------------|
| 10 мг/мл г-антидота, 10 мМ трис, 45 мМ L-аргинина HCl, 2% мас./об. сахарозы, 5% мас./об. маннита, 0,01% полисорбата 80, pH 7,8 | -15                         |
| 20 мг/мл г-антидота, 10 мМ трис, 45 мМ L-аргинина HCl, 2% мас./об. сахарозы, 5% мас./об. маннита, 0,01% полисорбата 80, pH 7,8 | -14                         |

После восстановления г-антидота для инъекции СВДИ, 50 мг/флакон, состав имеет pH 7,8 с осмоляльностью ~480 мОsm/кг. Следовательно, восстановленный ЛП приемлем для внутривенного введения.

Общий объем раствора г-антидота получают в концентрации 3,0 мг/мл в 10 мМ трис, pH 7,8±0,3, 4% сахарозы, 95 мМ аргинина, и хранят замороженным при -60°C или менее. Производство г-антидота для инъекций состоит из размораживания и смешивания 3 мг/мл общего объема раствора г-антидота, ультрафильтрации/диафильтрации против буферной смеси (10 мМ трис, 2% сахарозы, 5% маннита, 45 мМ аргинина HCl, pH 7,8) до конечной концентрации 10 мг/мл, добавления полисорбата 80 до 0,01% мас./мас., асептического наполнения, лиофилизации, закрытия пробкой, запечатывания алюминиевым колпачком и прикрепления этикетки к системе контейнер/укупорка г-антидота для инъекций.

В процессе производства г-антидота для инъекций применяются процедуры, которые были разработаны для производства других стерильных жидких лекарственных продуктов. Применяемым для получения г-антидота для инъекций способом стерилизации является 0,2 мкм фильтрация, г-антидот является термостабильным; следовательно, 0,2 мкм фильтрация представляет собой наиболее подходящий способ получения стерильного г-антидота для инъекций.

Процесс лиофилизации был разработан с применением рационального подхода на основании понимания физической природы компонентов состава на разных стадиях цикла лиофилизации. Для измерения Tg' (температуры стеклования замороженного концентрата) и Tc (температуры разрушения во время первичной сушки) применяли методы определения термических характеристик, включая дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и микроскопию лиофилизированных составов (МЛП). Цикл, показанный в таблице ниже, выбрали для лиофилизации партии-прототипа J7128. Этап отжига обеспечивает кристаллизацию маннита, которая гарантирует, что температура продукта не опускается ниже температуры разрушения во время первичной сушки. Температура первичной сушки была выбрана так, чтобы избежать разрушения лепешки при приемлемой продолжительности первичной сушки. 2-этапные условия вторичной сушки были разработаны так, чтобы получить лиофилизированный ЛП с уровнем влажности <1% (смотрите, например, табл. 6).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный состав для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащий от 10 до 55 мМ аргинина, от 1 до 3% сахарозы (мас./об.), от 2 до 8% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 5 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, тяжелую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH от 7,5 до 8.

2. Состав по п.1, содержащий от 40 до 50 мМ аргинина, от 1,5 до 2,5% сахарозы (мас./об.), от 4,5 до 5,5% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 10 мг/мл полипептида.

3. Состав по п.2, содержащий по меньшей мере 18 мг/мл полипептида.

4. Состав по п.2, отличающийся тем, что остаток Asp29 легкой цепи производного fXa модифицирован до (3R)-3-гидроксиAsp.

5. Состав по п.1, отличающийся тем, что полипептид содержит по меньшей мере внутрицепочечную дисульфидную связь в каждой из цепей.

6. Водный состав для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащий около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 10 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, тяжелую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH около 7,8.

7. Водный состав для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащий около 45 мМ аргинина, около 2% сахарозы (мас./об.), около 5% маннита (мас./об.) и около 20 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, тяжелую цепь производного fXa, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH около 7,8.

8. Водный состав для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащий от 10 до 55 мМ аргинина, от 1 до 3% сахарозы (мас./об.), от 2 до 8% маннита (мас./об.) и по меньшей мере 5 мг/мл двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или идентичной ей по меньшей мере на 90%, тяжелую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 или идентичной ей по меньшей мере на 90% и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, при этом состав имеет pH от 7,5 до 8.

9. Состав по п.8, отличающийся тем, что двухцепочечный полипептид имеет модификации в одном или более остатков 1-45 и одном или более остатков Arg306, Glu310, Arg347, Lys351, S379, Lys414 или Arg424 белка fXa дикого типа, при этом двухцепочечный полипептид способен связываться с ингибитором fXa, но не образует комплекс протромбиназы.

10. Способ получения лиофилизированного состава для предупреждения или уменьшения кровотечения, включающий лиофилизацию водного состава по любому из пп.1-9.

11. Лиофилизированная композиция для предупреждения или уменьшения кровотечения, полученная путем лиофилизации водного состава по любому из пп.1-9.

12. Лиофилизированная композиция для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащая по меньшей мере 10 мас.% двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, тяжелую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, и L-аргинин-HCl:сахарозу:маннит в массовом соотношении в диапазоне (0,5-1,4):(1-3):(2-8).

13. Лиофилизированная композиция по п.12, содержащая по меньшей мере 18 мас.% двухцепочечного полипептида.

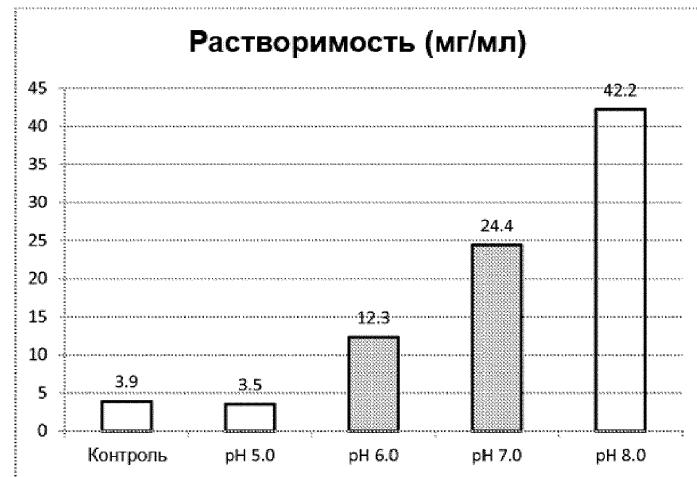
14. Лиофилизированная композиция по п.12, отличающаяся тем, что массовое соотношение L-аргинин-HCl:сахароза:маннит находится в диапазоне (0,9-1):(1,5-2,5):(4,5-5,5).

15. Лиофилизированная композиция для предупреждения или уменьшения кровотечения, содержащая по меньшей мере 10 мас.% двухцепочечного полипептида, содержащего легкую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, тяжелую цепь производного fXa с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, и дисульфидную связь между первым остатком цистеина в положении 98 (Cys98) SEQ ID NO: 4 и вторым остатком цистеина в положении 108 (Cys108) SEQ ID NO: 5, и L-аргинин-HCl:сахарозу:маннит в массовом соотношении около 0,95:2:5.

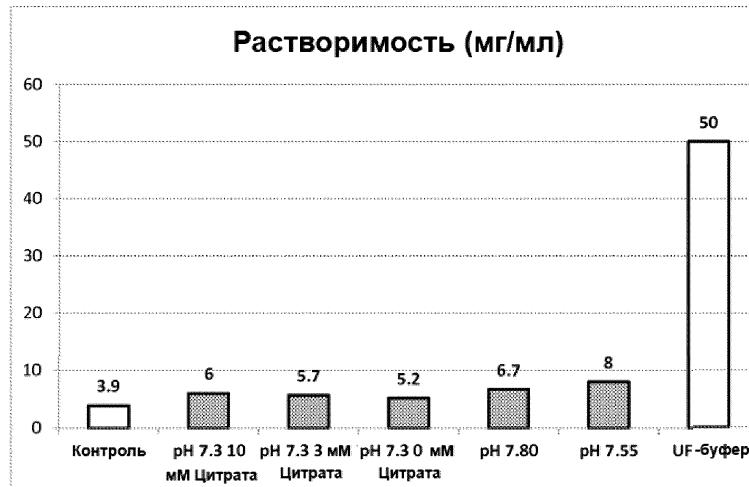
16. Способ уменьшения кровотечения у субъекта, проходящего терапию антикоагулянтами, с по-

мошью ингибитора фактора Xa, включающий стадию, в которой субъекту вводят раствор, полученный растворением лиофилизированной композиции по любому из пп.12-15 в водном растворителе.

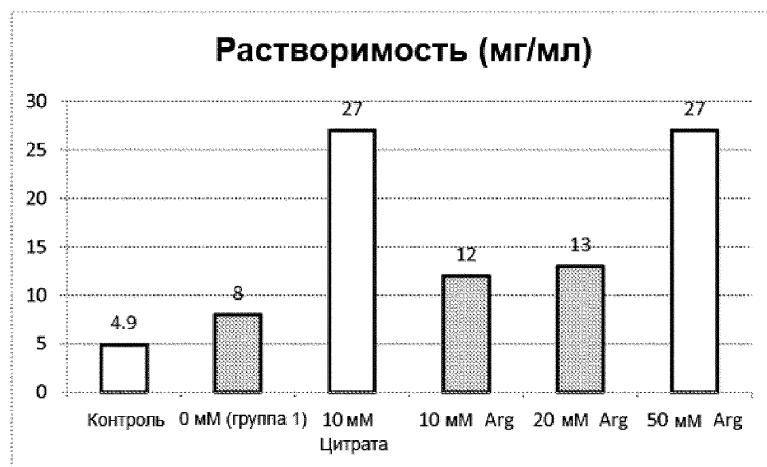
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что ингибитор фактора Xa представляет собой апиксабан, ривароксабан или бетриксабан.



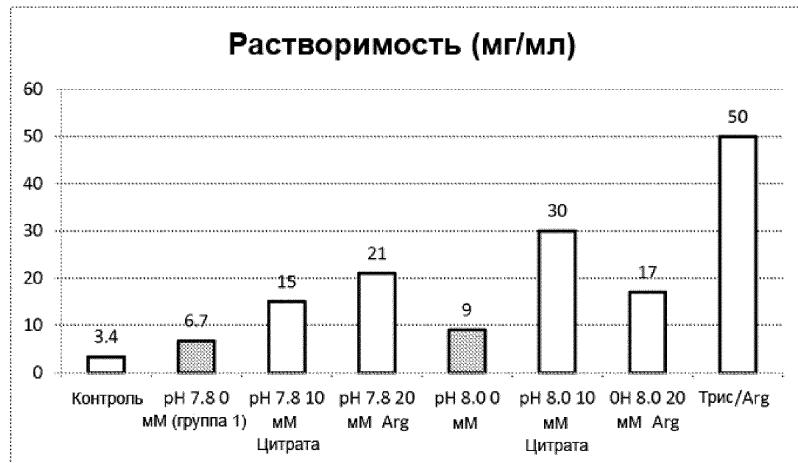
Фиг. 1А



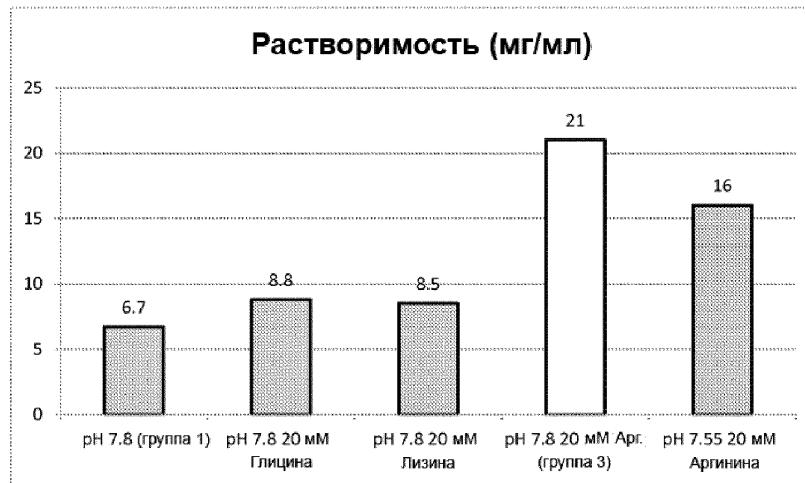
Фиг. 1В



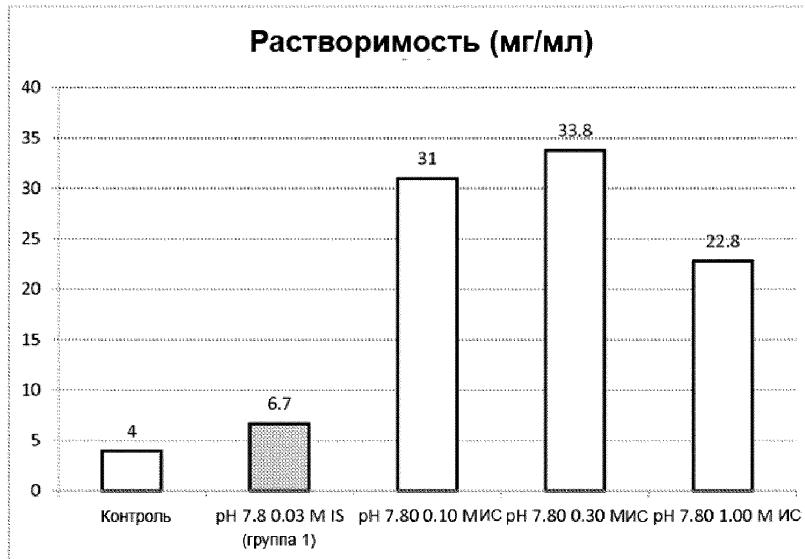
Фиг. 1С



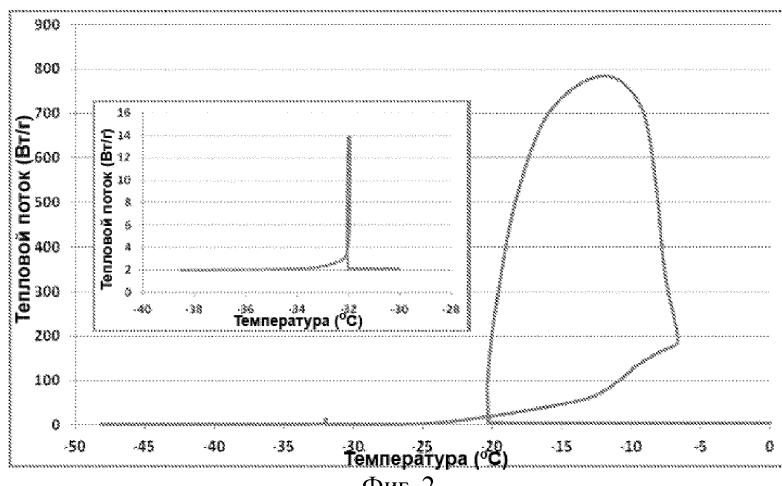
Фиг. 1Д



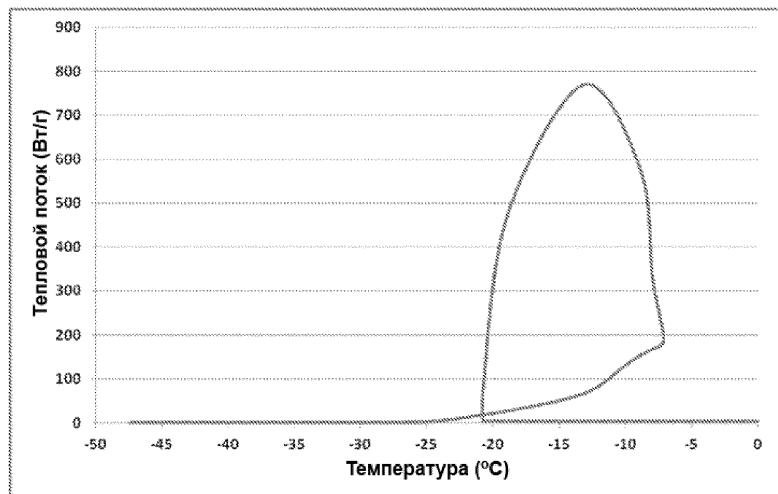
Фиг. 1Е



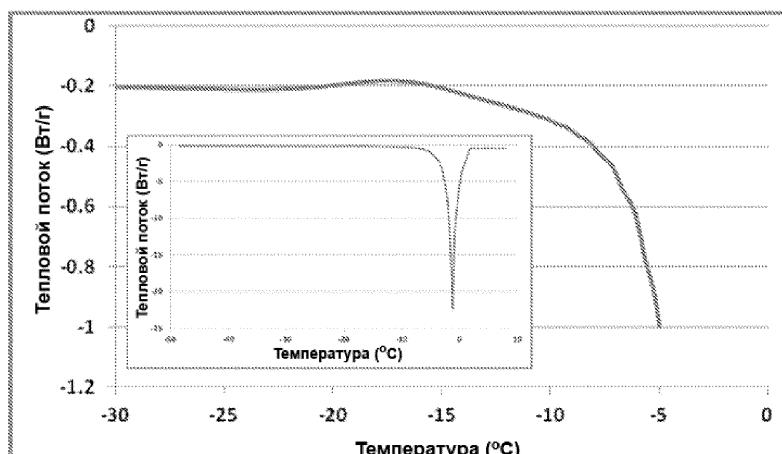
Фиг. 1F



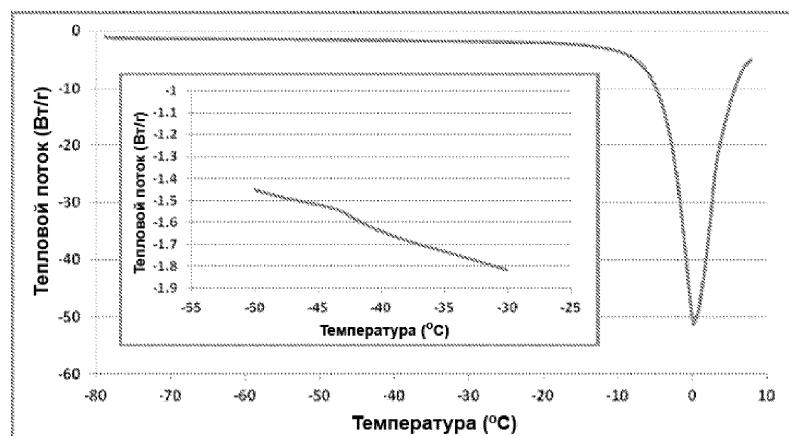
ФИГ. 2



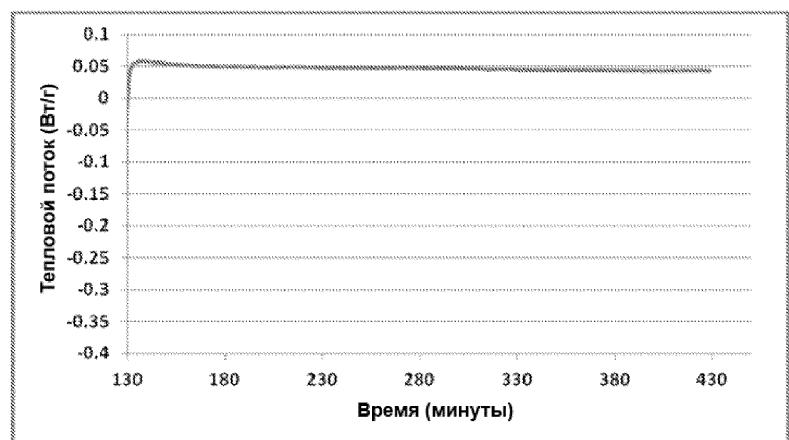
ФИГ. 3



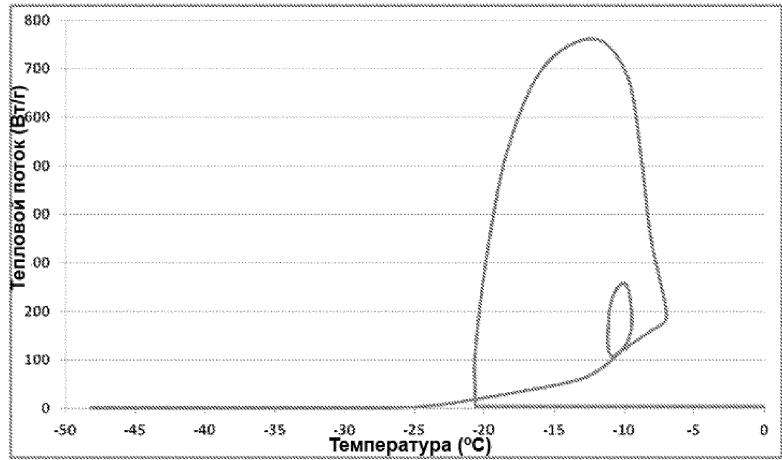
ФИГ. 4



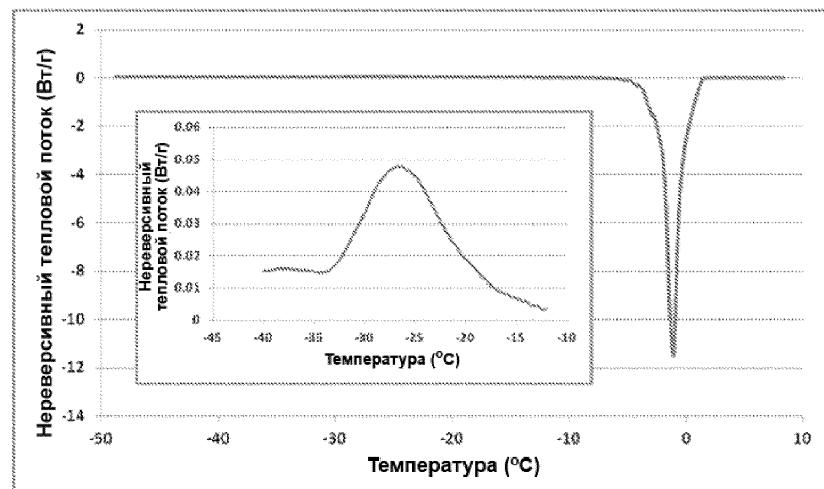
Фиг. 5



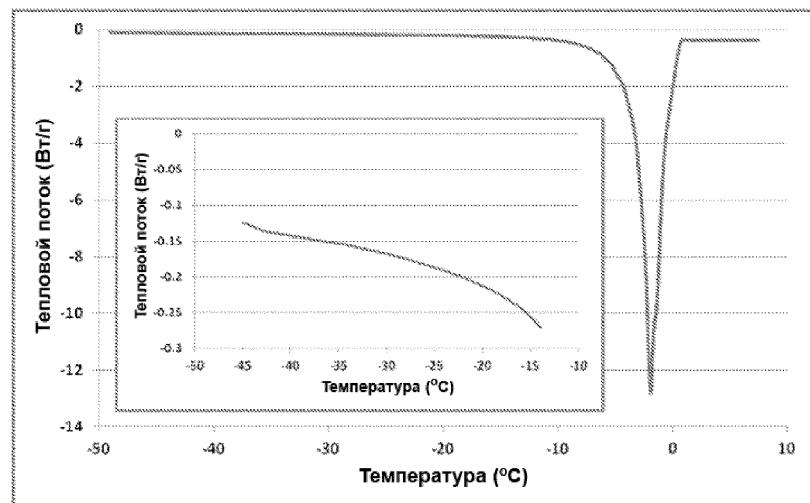
Фиг. 6



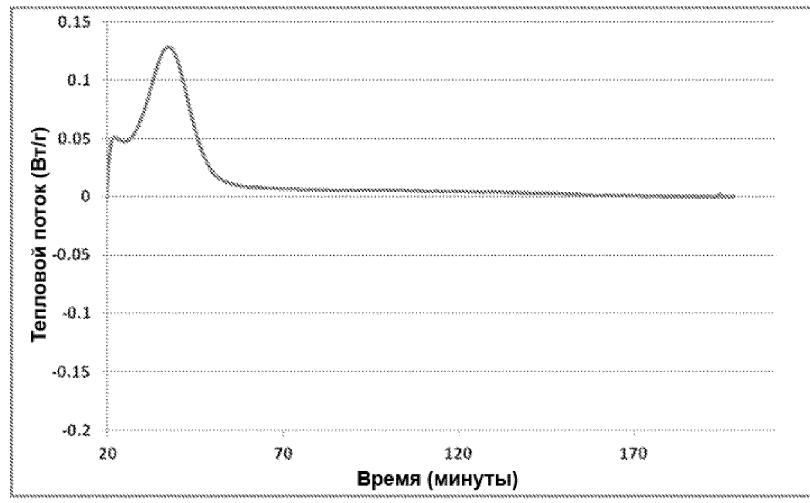
Фиг. 7



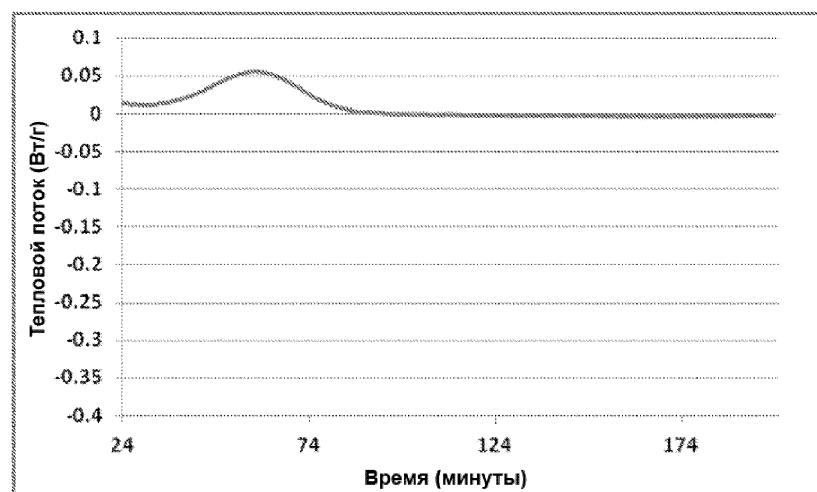
Фиг. 8



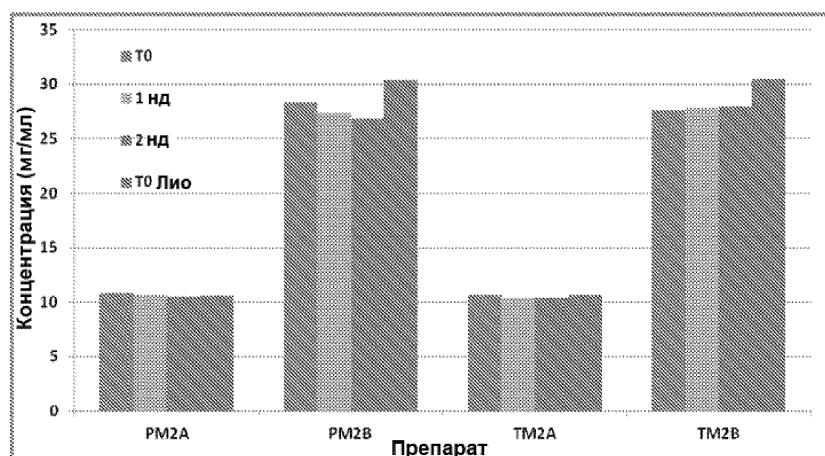
Фиг. 9



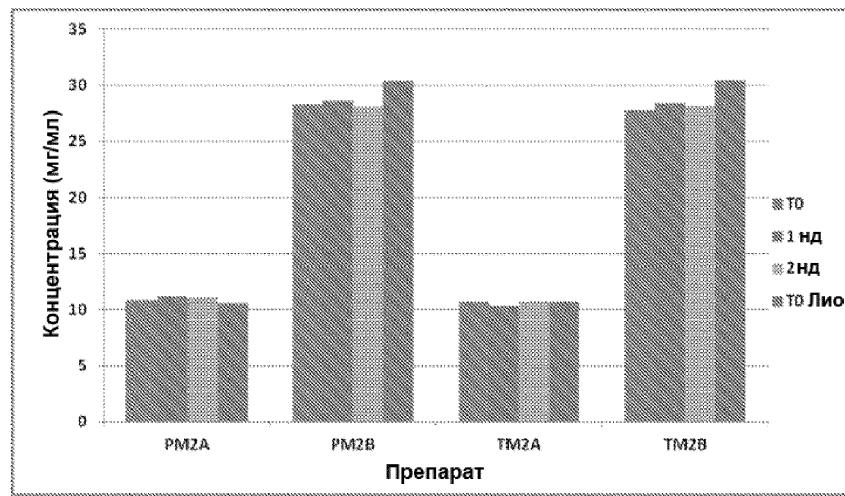
Фиг. 10



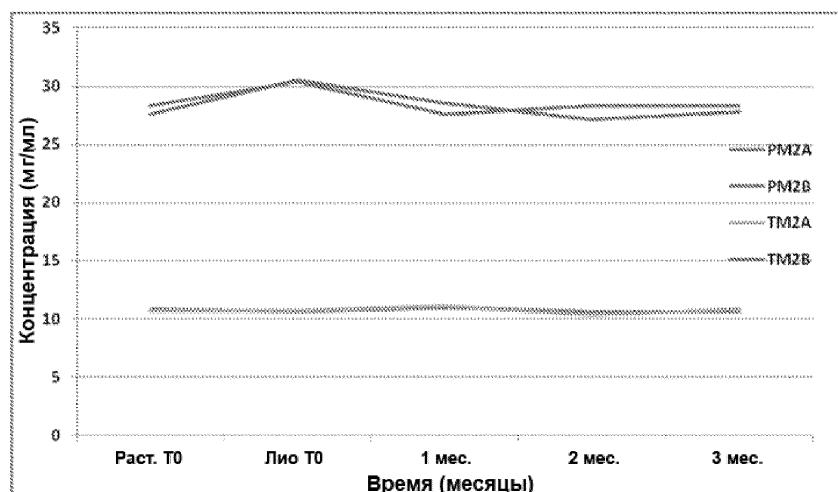
Фиг. 11



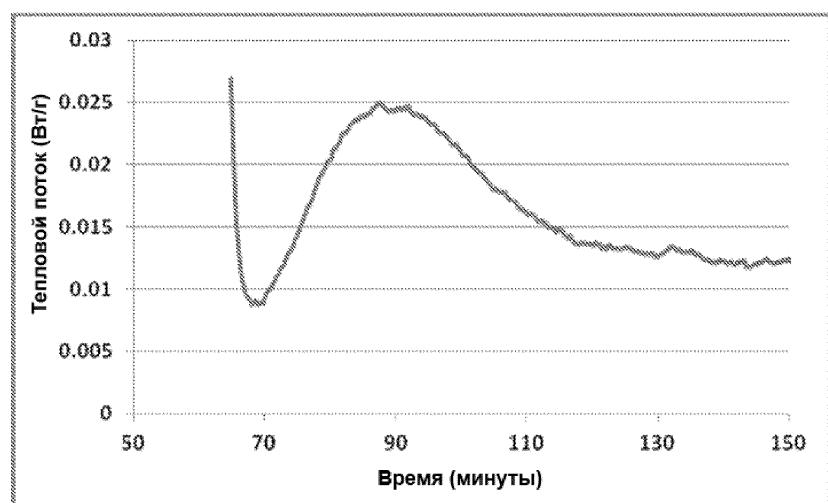
Фиг. 12



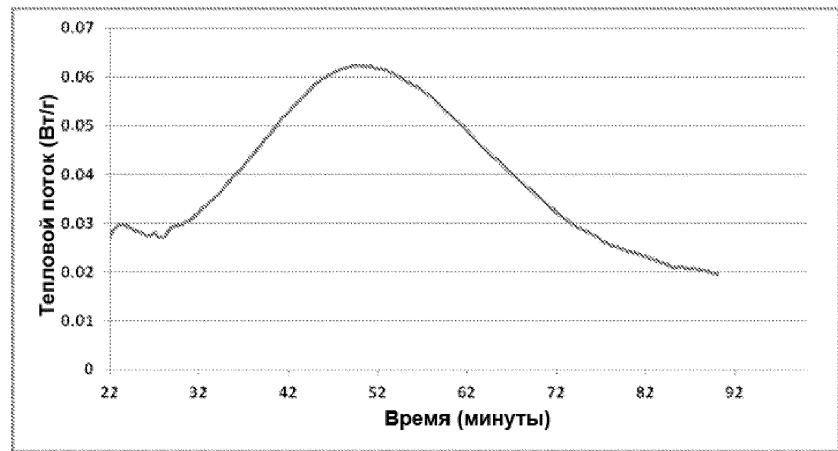
Фиг. 13



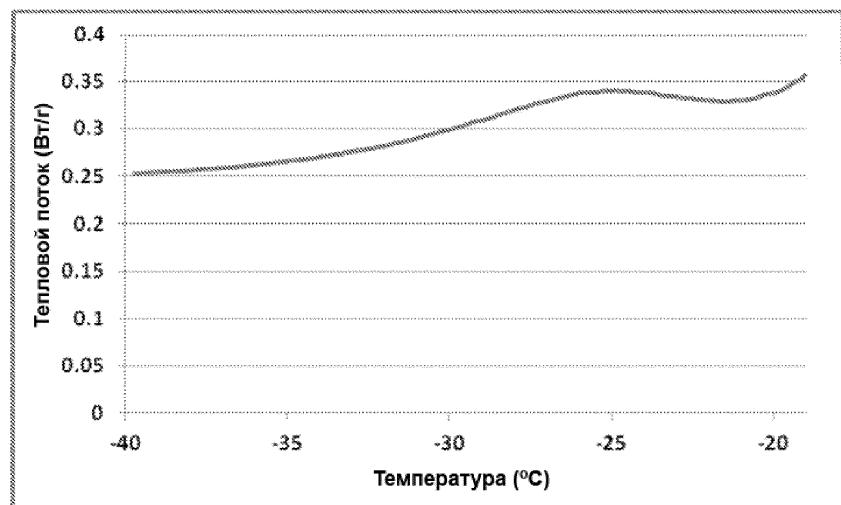
Фиг. 14



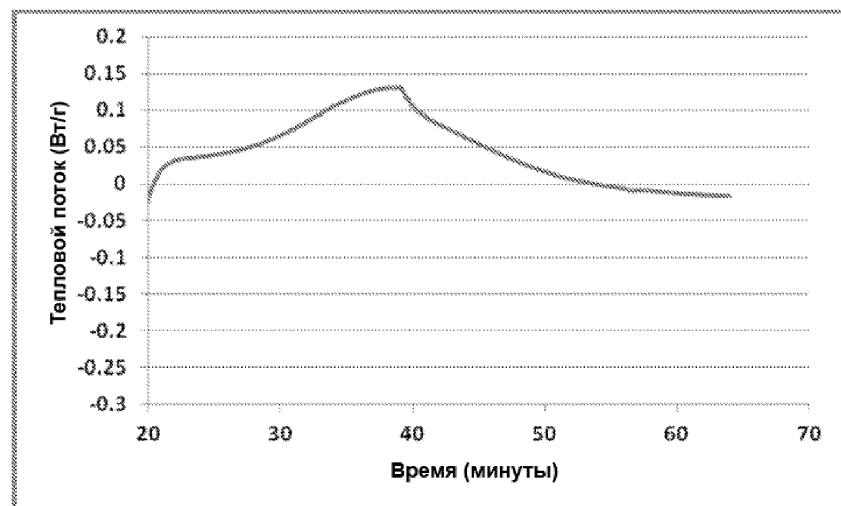
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

