



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/17 (2021.08); A61K 47/24 (2021.08); A61K 9/127 (2021.08); A61K 9/19 (2021.08); A61P 35/00 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2020134655, 02.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.11.2018

Дата регистрации:
16.03.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.03.2018 US 62/647,058;
31.05.2018 US 62/678,668

(45) Опубликовано: 16.03.2022 Бюл. № 8

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 23.10.2020(86) Заявка РСТ:
US 2018/059016 (02.11.2018)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/182650 (26.09.2019)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

**МОНСОН, Эллен К. (US),
ВЭЙ, Сяочэнь (US),
ТАКИГИКУ, Рей (US),
КРУЗ, Ш, Чарльз А (US),
ВАЙС, Джозеф В. (US)**

(73) Патентообладатель(и):

**БИКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК.
(US)**

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 7834147 B2, 16.11.2010. WO
2014078522 A1, 22.05.2014. CHEN C. ET AL., An
overview of liposome lyophilization and its future
potential, JOURNAL OF CONTROLLED
RELEASE, 2010, v. 142, n. 3, p.299 - 311. JENA
S. ET AL., Effects of Excipient Interactions on
the State of the Freeze-Concentrate and Protein
Stability, PHARMACEUTICAL RESEARCH,
2016, v. (см. прод.)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ САПОЗИНА С И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к композициям на основе сапозина С, и может быть использовано в медицине для лечения рака. Предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептид с SEQ ID NO: 1, включающий от нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций; липид фосфатидилсерина; буфер с рН в диапазоне от 5,0 до 8 в концентрации от 10 до 50 мМ; трегалозу в концентрации от 1,5 до 9% (мас./

об.); и воду. Причем полипептид находится в концентрации от 0,4 до 5 мг/мл, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1. Изобретение обеспечивает повышение стабильности и чистоты лиофилизированных композиций нановезикул SapC-DOPS, сохраняющих терапевтическую активность сапозина С после хранения. 5 н. и 36 з.п. ф-лы, 30 ил., 31 табл., 15 пр.

(56) (продолжение):

34, n. 2, p. 462 - 478. RU 2266129 C2, 20.12.2005. YANG X.J. et al., High-level expression and deletion mutagenesis of human tryptophan hydroxylase, Proc Natl Acad Sci USA, 1994, v.91, n.14, p.6659-6663. FRANKEL A.E. et al., Characterization of diphtheria fusion proteins targeted to the human interleukin-3 receptor, Protein Eng., 2000, v.13, n.8, p.575-581. PAKULA A.A. et al., Genetic analysis of protein stability and function. Anna. Rev. Genet. 1989, v.23, p.289-310. TOKURIKI N. ET AL., Stability effects of mutations and protein evolvability, Curr. Opin. Struct. Biol., 2009, v.19, n.5, p.596-604. ANPING LIU et al., Role of lysine residues in membrane anchoring of saposin C, Arch Biochem Biophys, 2005, v.443, n.1-2, p.101-112. CASAL H. L. et al., Infrared and 31P-NMR studies of the effect of Li+ and Ca2+ on phosphatidylserines, Biochimica et Biophysica Acta, 1987, v.919, n.3, p. 275-286. MU-PING NIEH et al., Spontaneously Forming Ellipsoidal Phospholipid Unilamellar Vesicles and Their Interactions with Helical Domains of Saposin C, Langmuir, 2006, n.22, p.11028-11033. КОСТАНТИНО Г.Р. и др. ПОВРЕЖДЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВ. Обзор, БИОХИМИЯ, 1998, том 63, вып. 3, с. 422 — 429. MULLER S. et al., Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial, Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 2008, V. 58, N. 12, p.3873-3883.

R U 2 7 6 7 1 9 9 C 1

R U 2 7 6 7 1 9 9 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 38/17 (2021.08); *A61K 47/24* (2021.08); *A61K 9/127* (2021.08); *A61K 9/19* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08)

(21)(22) Application: **2020134655, 02.11.2018**(24) Effective date for property rights:
02.11.2018Registration date:
16.03.2022

Priority:

(30) Convention priority:
23.03.2018 US 62/647,058;
31.05.2018 US 62/678,668(45) Date of publication: **16.03.2022** Bull. № 8(85) Commencement of national phase: **23.10.2020**(86) PCT application:
US 2018/059016 (02.11.2018)(87) PCT publication:
WO 2019/182650 (26.09.2019)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"

(72) Inventor(s):

MONSON, Ellen K. (US),
WEI, Xiaochen (US),
TAKIGIKU, Ray (US),
CRUZE, III, Charles A (US),
WYSE, Joseph W. (US)

(73) Proprietor(s):

BEXION PHARMACEUTICALS INC. (US)(54) **PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS OF SAPOSIN C AND METHODS FOR TREATING CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to the field of biotechnology, specifically, to compositions based on saposin C, and can be used in medicine for treating cancer. Proposed is a pharmaceutical composition containing a polypeptide with SEQ ID NO: 1, including from zero to four amino acid inserts, substitutions, or deletions; a phosphatidyl serine lipid; a buffer with a pH in the range from 5.0 to 8 at a concentration of 10 to 50 mM; trehalose at a concentration of 1.5 to 9%

(wt./vol.); and water. The polypeptide is therein taken in a concentration of 0.4 to 5 mg/ml, and the molar ratio of the phosphatidyl serine lipid to the polypeptide is in the range from 8:1 to 20:1.

EFFECT: invention provides an increase in the stability and purity of lyophilised compositions of SapC-DOPS nanovesicles preserving the therapeutic activity of saposin C after storage.

41 cl, 30 dwg, 31 tbl, 15 ex

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Для настоящей заявки испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США 62/647,058, поданной 23 марта 2018, и предварительной заявке на патент США 62/678,668, поданной 31 мая 2018.

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим сапозин С, и способам их применения для лечения различных онкологических состояний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сапозины, семейство небольших (~80 аминокислот) термостабильных
10 гликопротеинов, которые необходимы для гидролитической активности *in vivo* некоторых лизосомальных ферментов в катаболическом пути гликофинголипидов. Сапозины А, В, С и D описаны в патентах США №№ 7,834,147 и 9,271,932.

Нановезикулы, содержащие сапозин С («SapC») и диолеил фосфатидилсерин (DOPS), обладают высоким сродством к богатым фосфатидилсерином мембранам *in vitro* и *in vivo* и могут вызывать апоптоз и некроз в клетках-мишенях (Qi et al. (2009), Clin Cancer Res 2009; 15:5840-5851). Предлагаемый механизм, с помощью которого нановезикулы SapC-DOPS индуцируют апоптоз, заключается в повышении уровня церамидов за счет активации β-глюкозидазы и кислой сфингомиелиназы (с последующей деградацией соответственно глюкозилцерамида и сфингомиелина), что приводит к активации каспаз.
20 Было обнаружено, что препарат из нановезикул является эффективным против широкого спектра типов опухолей *in vitro* и на мышинных моделях ортотопических опухолей (Qi et al. (2009); Wojton et al. (2013), Mol Ther, 21:1517-1525; Abu-Baker et al. (2012), J Cancer Ther, 3:321-326; Chu et al. (2013), PLoS One; 8:e75507; Патент США № 7834147).

25 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к водным и твердым композициям, содержащим сапозин С, и способам применения таких композиций при лечении рака.

Описана композиция, которая включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, содержащую от нуля до четырех аминокислотных
30 вставок, замен или делеций; липид фосфатидилсерина; буфер с pH от 5,0 до 8,0; трегалозу в количестве от 1,5 до 9 мас.%; трет-бутиловый спирт в количестве от 0 до 35%; и воду. Концентрация полипептида составляет от 0,4 до 5,0 мг/мл, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой трис(гидроксиметил)
35 аминокетан (Трис) в концентрации от 10 до 50 мМ, и pH композиции находится в диапазоне от 6,8 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления липид фосфатидилсерина содержит один
40 или более из диолеил фосфатидилсерина (DOPS), липида дигексаноил фосфатидилсерина, липида диоктаноил фосфатидилсерина, липида дидеканоил фосфатидилсерина, липида дилауроил фосфатидилсерина, липида димиристоил фосфатидилсерина, липида дипальмитоил фосфатидилсерина, липида пальмитоил-олеил фосфатидилсерина, липида 1-стеароил-2-олеил фосфатидилсерина или липида
45 дифитаноил фосфатидилсерина. Липид фосфатидилсерина предпочтительно представляет собой DOPS, который может быть в форме соли, такой как натриевая соль. В различных случаях полипептид включает или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или последовательности SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными

вставками, заменами или делециями. В предпочтительном варианте осуществления композиция включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, в концентрации от 1,9 до 2,5 мг/мл; DOPS в концентрации от 2,0 до 2,8 мг/мл; Трис в концентрации от 23 до 27 мМ; трегалозу в концентрации от 4 до 6 мас.%; и трет-бутиловый спирт в концентрации от примерно 15 до 25 мас.%; причем значение рН находится в диапазоне от 6,8 до 7,6.

Также описана композиция в твердой форме, например, композиция в виде лиофилизированного порошка, которая включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, содержащую от нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций; липид фосфатидилсерина; буфер; и трегалозу в количестве от 75 до 90 мас.%. Концентрация полипептида в этой композиции составляет от 3,2 до 4,4 мас.%, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой Трис в количестве от 5,6 до 7,6 мас.%. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер в количестве от 9 до 13 мас.%. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер в количестве от 3 до 5 мас.%. В некоторых вариантах осуществления липид фосфатидилсерина включает один или более из диолеил фосфатидилсерина (DOPS), липида дигексаноил фосфатидилсерина, липида диоктаноил фосфатидилсерина, липида дидеканоил фосфатидилсерина, липида дилауроил фосфатидилсерина, липида димиристоил фосфатидилсерина, липида дипальмитоил фосфатидилсерина, липида пальмитоил-олеил фосфатидилсерина, липида 1-стеароил-2-олеил фосфатидилсерина или липида дифитаноил фосфатидилсерина. В различных случаях композиция включает или состоит из полипептидной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или включает последовательность SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными вставками, заменами или делециями. В некоторых вариантах осуществления эта композиция включает трет-бутиловый спирт в количестве менее чем 3 мас.%. В предпочтительном варианте осуществления твердая композиция включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 в концентрации от 3,3 до 4,3 мас.%; DOPS (например, натриевую соль) в концентрации от 3,4 до 4,8 мас.%; Трис в концентрации от 6,0 до 7,2 мас.%; трегалозу в концентрации от 81 до 87,3 мас.%; и трет-бутиловый спирт в концентрации менее чем 3 мас.%.
Также описана фармацевтическая композиция, которая включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, содержащую от нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций; липид фосфатидилсерина; буфер со значением рН от 5,0 до 8; трегалозу в количестве от 1,5 до 9% (мас./об.); и воду. Полипептид находится в концентрации от 0,4 до 5 мг/мл, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой трис в концентрации от 10 до 50 мМ, и рН композиции находится в диапазоне от 6,8 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой ацетатный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления липид фосфатидилсерина содержит один или более из DOPS, липида дигексаноил фосфатидилсерина, липида диоктаноил фосфатидилсерина, липида дидеканоил фосфатидилсерина, липида дилауроил фосфатидилсерина, липида димиристоил фосфатидилсерина, липида дипальмитоил фосфатидилсерина, липида пальмитоил-олеил фосфатидилсерина, липида 1-стеароил-2-олеил фосфатидилсерина или липида

дифитаноил фосфатидилсерина, и предпочтительно представляет собой DOPS, например, натриевую соль DOPS. В различных случаях полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными вставками, 5 заменами или делециями. В некоторых вариантах осуществления эта композиция включает трет-бутиловый спирт в количестве менее чем 3%. В предпочтительном варианте осуществления композиция включает: полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 в концентрации от 1,9 до 2,5 мг/мл; DOPS (предпочтительно в форме натриевой соли) в концентрации от 2,0 до 2,8 мг/мл; 10 Трис в концентрации от 23 до 27 мМ; трегалозу в концентрации от 4 до 6 мас.%; трет-бутиловый спирт в количестве менее чем 0,5 мас.%; причем рН находится в диапазоне от 6,8 до 7,6 (более предпочтительно от 7,0 до 7,4 или от 7,1 до 7,3).

Также описан способ лечения рака, который может представлять собой солидную опухоль. Примеры раковых заболеваний, которые поддаются лечению этим способом, 15 включают глиому, эпендимому и рак желудочно-кишечного тракта, такой как аденокарцинома прямой кишки. Способ включает введение больному раком человеку фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ включает восстановление твердой композиции, раскрытой в настоящем описании, в воде или физиологическом растворе для получения 20 восстановленной композиции и внутривенное введение пациенту дозы восстановленной композиции. В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют внутривенно в дозе от 0,4 мг/кг до 7 мг/кг SapC, и отношение SapC к DOPS в композиции находится в диапазоне от 1:8 до 1:20. В некоторых вариантах осуществления композицию доставляют внутривенно в дозе от 2,3 до 2,5 мг/кг SapC, и отношение SapC к DOPS в 25 композиции находится в диапазоне от 1:11 до 1:13. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят пациенту несколько раз, по меньшей мере, в течение двух циклов, как показано ниже:

Цикл 1:

неделя 1: по одной дозе в каждый из дней 1-5;
30 неделя 2: 3 раза в неделю через день, например по одной дозе в дни 8, 10 и 12;
недели 3 и 4: по одной дозе каждую неделю (каждые 7 (+/-3) дней);

Цикл 2:

одна доза в течение недели 5; и
любой последующий цикл:
35 одна доза через 28 (+/-3) дней после введения последней предыдущей дозы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг.1 представляет собой график, демонстрирующий результаты анализа DSC, полученные для образца 75312-F10.

40 Фиг.2 представляет собой график, демонстрирующий результаты анализа CD, полученные для образцов, приведенных в таблице 2.

Фиг.3 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание α -спирали и случайного клубка, оцененное по результатам анализа CD, полученным для образцов, приведенных в таблице 2.

45 Фиг.4 представляет собой график, демонстрирующий значение оптической плотности при 310 нм для каждого образца, приведенного в таблице 4.

Фиг. 5 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC) чистоты SapC в приведенных в таблице 4 образцах в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C.

Фиг. 6 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой (RP-HPLC) чистоты SapC в приведенных в таблице 4 образцах в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C .

5 Фиг. 7 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ (IEC-HPLC) чистоты SapC в приведенных в таблице 4 образцах в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C .

Фиг. 8 представляет собой график, демонстрирующий оптическую плотность каждой композиции из Таблицы 8, измеренную при 310 нм в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C .

10 Фиг. 9 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C .

Фиг. 10 представляет собой график, представляющий результаты измерения методом эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 15 10 дней при 60°C .

Фиг. 11 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C .

Фиг. 12 представляет собой график, демонстрирующий значение pH каждого образца 20 из Примера 4.

Фиг. 13 представляет собой график, демонстрирующий содержание белка в каждом образце из Примера 4.

Фиг. 14 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты и процента восстановления SapC в восстановленных 25 композициях в момент $t=0$ и после хранения в течение 2 недель при 50°C для образцов, приведенных в таблице 14.

Фиг. 15А-В представляют собой графики, демонстрирующие результаты динамического рассеяния света для образца 76114-F5 в момент $t=0$ (А) и через 5 недель (В) при 50°C .

30 Фиг. 16А-В представляют собой графики, демонстрирующие результаты динамического рассеяния света для образца 76114-F6 в момент $t=0$ (А) и через 5 недель (В) при 50°C .

Фиг. 17 представляет собой график, демонстрирующий результаты динамического рассеяния света каждого восстановленного образца в момент $t=0$ для образцов, 35 приведенных в Таблице 21.

Фиг. 18 представляет собой график, демонстрирующий изменение динамического рассеяния света каждого восстановленного образца с течением времени для образцов, приведенных в Таблице 21.

Фиг. 19 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание ТВА 40 в каждом восстановленном образце композиций из Таблицы 22.

Фиг. 20 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание ТВА в каждом восстановленном образце композиций из Таблицы 23.

Фиг. 21А-Д представляют собой графики, демонстрирующие распределение частиц по размерам в трех повторных измерениях восстановленных жидкостей для некоторых 45 композиций из Таблицы 23.

Фиг. 22 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты SapC в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение

2 или 4 недели, для образцов, приведенных в Таблице 26.

Фиг. 23 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ион-экслюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение 2 или 4 недели, для образцов, приведенных в таблице 26.

Фиг. 24 представляет собой график, демонстрирующий зависимость среднего размера частиц от времени в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение 2 или 4 недели, для образцов, приведенных в таблице 26.

Фиг. 25 представляет собой график, демонстрирующий результаты тестирования активности SapC-DOPS в ферментном анализе GBA.

Фиг. 26 представляет собой таблицу, показывающую демографические характеристики и нежелательные явления по группам дозирования на фазы 1a.

Фиг. 27A-C представлены три набора графиков, демонстрирующих профили средней концентрации SapC в плазме в зависимости от времени при многократном внутривенном введении VXQ-350 в течение 0,75 ч каждые 24 часа в день 1 (фиг. 27A), день 4 (фиг. 27B) и день 22 (фиг. 27C) у пациентов с солидными опухолями (линейный log).

На фиг. 28A-D представлены результаты гистологического анализа и макроанатомического анализа, выполненные после смерти; слева направо: (A) Исходный хирургический образец показал небольшое количество признаков эндиметриальной дифференцировки и обильные митотические фигуры. H&E при 40-кратном увеличении; (B) Общий анализ мозга при вскрытии показал обширный некроз опухоли; (C) Микроскопическое исследование срезов опухоли показало наличие небольшой жизнеспособной опухоли и некроз (H&E при 4-кратном увеличении со вставкой при 40-кратном увеличении); (D) При вскрытии была обнаружена обширная дифференцировка хондроидов в том месте, где опухоль распространилась через хирургический дефект и в кожу головы.

На фиг. 29 представлен график пловца, демонстрирующий результаты пациента на фазе 1A клинического испытания.

На фиг. 30A и 30B приведена пара изображений позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) в начале лечения (фиг. 30A) и через более чем 12 месяцев лечения (фиг. 30B).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения рака, такого как солидные опухоли, включая рак мозга. Композиции включают полипептид сапозина, такого как сапозин C (SapC), и фосфатидилсерин или его структурный аналог, например диолеил фосфатидилсерин (DOPS).

Термины «аминокислота» или «аминокислотная последовательность», используемые в настоящем описании, относятся к олигопептидной, пептидной, полипептидной или белковой последовательности или их фрагменту, а также к природным или синтетическим молекулам. Если «аминокислотная последовательность» приведена в настоящем описании для обозначения аминокислотной последовательности встречающейся в природе белковой молекулы, то «аминокислотная последовательность» и подобные термины не ограничены полноразмерной природной аминокислотной последовательностью, которая ассоциирована с указанной молекулой белка.

Используемый в настоящем описании термин «делеция» относится к изменению аминокислотной или нуклеотидной последовательности, которое приводит к отсутствию одного или более аминокислотных остатков или нуклеотидов.

Используемые в настоящем описании слова «вставка» или «добавление» относятся

к изменениям в аминокислотной или нуклеотидной последовательности, приводящим к добавлению одного или более аминокислотных остатков или нуклеотидов, соответственно, к последовательности, присутствующей во встречающейся в природе молекуле.

5 Термин «фузогенный (слитый) белок или полипептид» в контексте настоящего описания относится к белку или пептиду, который при добавлении к двум отдельным двухслойным мембранам может вызвать их слияние в единую мембрану. Фузогенный белок способствует созданию тесного контакта между клеточными или модельными мембранами, приводя к их слиянию. Подходящие лизосомные фузогенные белки и
10 полипептиды для использования в настоящем изобретении включают, без ограничения, белки семейства сапозин.

Используемый в настоящем описании термин «сапозин» относится к семейству белков и полипептидов, являющихся производными просапозина, включая, без ограничения, природные сапозины А, В, С и D (человека или других видов животных, таких как мыши, крысы, свиньи и коровы; см., например, Qi et al. (1996) J. Biol. Chem. 271 (12):6874-6880 (включено в виде ссылки)), а также синтетические белки и пептиды, производные сапозина, и аналоги пептидов, обладающие фузогенной активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид сапозина содержит или состоит из аминокислотной последовательности человеческого SapC: Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val
15 Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu ProLys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly (SEQ ID NO:1). В других вариантах осуществления полипептид SapC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, содержащую от
20 нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций, например, всего одно, два, три или четыре таких изменений. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида SapC содержит SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными вставками, заменами или делециями или комбинацией таких изменений. Также включены аналоги полипептидов, обладающие некоторой
25 фузогенной активностью человеческого SapC. «Аналог» означает полипептид с заменами или другими изменениями в аминокислотной последовательности SapC, причем замены или изменения не оказывают отрицательного влияния на фузогенные свойства полипептида. Таким образом, аналогом может быть полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу идентичную SEQ ID NO: 1, и в
30 которой один или более аминокислотных остатков консервативно замещены химически подобными аминокислотами. Примеры консервативных замен включают замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, другим остатком. Аналогичным образом, настоящее изобретение предполагает замещение одного полярного (гидрофильного) остатка, например, между
35 аргинином и лизином, между глутамином и аспарагином и между глицином и серином. Также рассматривается замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, другим или замена одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, другим остатком.

SapC и полученные из него полипептиды могут быть получены любым подходящим
40 способом, таким как, например, химический, ферментативный или рекомбинантный. Способы получения полипептидов и их фрагментов известны в данной области и включают, без ограничения, химический синтез пептидов, системы трансляции *in vitro* и экспрессию (и очистку) в рекомбинантном организме-хозяине.

«Липидная везикула» и «липосома» используются взаимозаменяемо для обозначения, как правило, сферического кластера или агрегата из амфипатических липидов, обычно в форме одного или более концентрических слоев, например бислоев.

Термины «фосфатидилсерин» и «липид фосфатидилсерина» используются взаимозаменяемо для обозначения липидов, которые имеют две жирные кислоты, присоединенные через сложноэфирную связь к первому и второму атому углерода глицерина, и фрагмент серина, присоединенный через фосфоэфирную связь к третьему атому углерода глицерина. Примеры липидов фосфатидилсерина, которые можно использовать в композициях по настоящему изобретению, включают, без ограничения, следующие: липид диолеоил фосфатидилсерина (DOPS); липид дигексаноил фосфатидилсерина; липид диоктаноил фосфатидилсерина; липид дидеканоил фосфатидилсерина; липид дилауроил фосфатидилсерина; липид димиристоил фосфатидилсерина; липид дипальмитоил фосфатидилсерина; липид пальмитоил-олеоил фосфатидилсерина; липид 1-стеароил-2-олеоил фосфатидилсерина; и липид дифитаноил фосфатидилсерина, причем DOPS является предпочтительным. В водных композициях при нейтральном pH такие липиды фосфатидилсерина обычно существуют в форме соли с катионом, и поэтому ссылки на DOPS и другие липиды фосфатидилсерина, используемые в композициях по настоящему изобретению, включают как солевые, так и несолевые формы липидов. Подходящие катионы включают любой фармацевтически приемлемый катион, который образует соль с липидом фосфатидилсерина, такой как любой из следующих: ион аммония; ион L-аргинина; ион бензатина; ион деанола; ион диэтанолamina (2,2'-иминодиэтанол); ион гидрабина; ион лизина; ион калия; ион натрия; ион триэтанолamina (2,2',2''-нитрилотри(этан-1-ол)); и ион трометамина (2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диола). Предпочтительными являются соли натрия, калия и аммония.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать буферные агенты. Примеры буферных агентов включают, без ограничения, ацетат, цитрат, гистидин, сукцинат и трис(гидроксиметил)аминометан (Трис; также известный как трометамин), а также известные производные Триса, например с модифицированной аминогруппой. В предпочтительном варианте осуществления настоящие водные композиции содержат Трис в концентрации от 10 до 50 мМ (предпочтительно от 20 до 30 мМ, например, 25 мМ), и pH этих композиций находится в диапазоне от pH 6,8 до 7,6 (например, от pH 7 до 7,4, например, pH от 7,1 до 7,3). В некоторых вариантах осуществления композиции содержат цитратный буфер или ацетатный буфер в концентрации от 10 до 50 мМ, и pH композиций находится в диапазоне от pH 5,0 до 8,0.

Биосовместимые полимеры, используемые в качестве стабилизирующих материалов и/или наполнителей, могут быть природного, полусинтетического (модифицированные природные) или синтетического происхождения. Используемый в настоящем описании термин «полимер» означает соединение, состоящее из двух или более повторяющихся мономерных единиц и предпочтительно 10 или более повторяющихся мономерных единиц. Используемый в настоящем описании термин «полусинтетический полимер» (или модифицированный природный полимер) означает природный полимер, который был каким-либо образом химически модифицирован. Примеры природных полимеров, подходящих для использования в настоящем изобретении, включают встречающиеся в природе полисахариды. Такие полисахариды включают, например, арабинаны, фруктаны, фуканы, галактаны, галактуронаны, глюканы, маннаны, ксиланы (такие как инулин), леван, фукоидан, каррагинан, галактокарлозу, пектиновую кислоту, пектин, амилозу, пуллулан, гликоген, амилопектин, целлюлозу, декстран, декстрин,

декстрозу, полидекстрозу, пстулан, хитин, агарозу, кератан, хондроитан, дерматан, гиалуроновую кислоту, альгиновую кислоту, ксантановую камедь, крахмал и различные другие природные гомополимеры или гетерополимеры, например, содержащие одну или более из следующих альдоз, кетоз, кислот или аминов: эритрозы, треозы, рибозы, арабинозы, ксилозы, ликсозы, аллозы, альтрозы, глюкозы, маннозы, гулозы, идозы, галактозы, талозы, эритролозы, рибулозы, ксилулозы, психозы, фруктозы, сорбозы, тагатозы, маннита, сорбита, лактозы, сахарозы, трегалозы, мальтозы, целлобиозы, глицина, серина, треонина, цистеина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина, гистидина, глюкуроновой кислоты, глюконовой кислоты, глюкуроновой кислоты, галактурановой кислоты, маннурановой кислоты, глюкозамина, галактозамина и нейраминаовой кислоты и их производных, встречающихся в природе. Примеры полусинтетических полимеров включают карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, метилцеллюлозу и метоксицеллюлозу. Примеры синтетических полимеров, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают полиэтилены (такие как, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ, PEG), полиоксиэтилен и полиэтилентерефталат), полипропилены (такие как, например, полипропиленгликоль), полиуретаны (такие как, например, поливиниловый спирт (ПВС, PVA), поливинилхлорид и поливинилпирролидон (ПВП, PVP)), полиамиды, включая нейлон, полистирол, полимолочные кислоты, фторированные углеводороды, фторированные углероды (такие как политетрафторэтилен) и полиметилметакрилат, а также производные любого из них. Способы получения композиций везикул, в которых используются полимеры в качестве стабилизирующих соединений, станут очевидными для специалистов в данной области после ознакомления с настоящим раскрытием, а именно с той частью настоящего раскрытия, которая связана с информацией, известной в данной области, например, описанной и упоминаемой в патенте США № 5205290, описание которого включено в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. В предпочтительной форме настоящие композиции содержат один или более компонентов из маннита, лактозы, трегалозы, сахарозы, ПЭГ, ПВП, сорбита или глюкозы.

Для приготовления заявленных композиций можно использовать широкий спектр доступных методов. В предпочтительном варианте осуществления DOPS или другой липид фосфатидилсерина солюбилизируют с органическим растворителем и затем объединяют с ингредиентами на водной основе, включая SapC, при температуре окружающей среды в течение 5-15 минут. Примеры органических растворителей, которые можно использовать для этой цели, включают, без ограничения, этанол, ДМСО, н-бутанол и трет-бутанол (также известный как трет-бутиловый спирт, ТВА). В предпочтительном варианте осуществления органический растворитель представляет собой трет-бутанол, например, с чистотой более 98%. При смешивании ингредиентов липид и SapC вместе образуют везикулы, суспендированные в водном растворе. Лиофилизация смеси приводит к удалению не только воды, но также большей части или всего органического растворителя. В предпочтительных вариантах осуществления лиофилизированный порошок содержит менее 3 мас.% ТВА.

Для приготовления липосомальных композиций можно использовать широкий спектр методов, известных специалистам в данной области. Эти методы включают, например, диализ против растворителя, френч-пресс, экструзию (с циклами замораживания-оттаивания или без них), испарение с обращенной фазой, простое замораживание-оттаивание, обработку ультразвуком, хелатный диализ, гомогенизацию, инфузию растворителя, микроэмульсификацию, самопроизвольное образование,

испарение растворителя, диализ против растворителя, контролируемый диализ детергентов и другие. См., например, Madden et al., Chemistry and Physics of Lipids, 1990 53, 37-46, раскрытие которого включено в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Подходящие методы замораживания-оттаивания описаны, например, в международной заявке PCT/US89/05040, поданной 8 ноября 1989 г., описание которой включено в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки. Липосомы можно получать в растворе, таком как водный солевой раствор, водный фосфатный буферный раствор или стерильная вода. Липосомы можно получать различными способами, которые включают перемешивание или перемешивание вихревым способом.

Многие методы получения липосом, которые могут быть адаптированы для использования при получении композиций везикул, обсуждаются, например, в патентах США № 4,728,578; заявке на патент Великобритании GB 2193095 A; патентах США №№ 4,728,575; 4,737,323; международной заявке PCT/US85/01161; Mayer et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol.858, pp.161-168 (1986); Hope et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol.812, pp.55-65 (1985); Mayhew et al., Methods in Enzymology, Vol.149, pp.64-77 (1987); Mayhew et al., Biochimica et Biophysica Acta, Vol.755, pp.169-74 (1984); Cheng et al, Investigative Radiology, Vol.22, pp.47-55 (1987); международной заявке PCT/US89/05040; патентах США №№ 4,533,254; 4,162,282; 4,310,505; 4,921,706; и Liposome Technology, Gregoriadis, G., ed., Vol.1, pp.29-31, 51-67, 79-108 (CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. 1984), описание каждого из которых включено в настоящее описание всей своей полноте в качестве ссылки.

Как будет понятно специалистам в данной области, любая из композиций везикул может быть лиофилизирована для хранения и может быть восстановлена, например, стерильной водной средой, подходящей для введения пациенту (такой как вода, раствор фосфатного буфера, раствор Трис буфера или водный солевой раствор), при необходимости путем сильного взбалтывания. Липосомы можно лиофилизировать способами, известными в данной области, включая методы, описанные Rey, L. (2010), Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products. ISBN 9781439825754, релевантные части которого включены посредством ссылки. В типичных способах лиофилизации используются фазы замораживания, первичной сушки и вторичной сушки в соответствии с параметрами, приведенными в таблице I.

Таблица I. Примерные диапазоны параметров лиофилизации

Этап цикла	Температура, °C	Давление, Па (mTorr)	Продолжительность, минуты
Замораживание	-40 до -50 (не выше -40)	-	340-960
Первичная сушка	-15 до -25	4,9-10 (30-65)	2200-4300
Вторичная сушка	25 до 35	5,6-10 (35-65)	500-2300
Весь цикл	-	-	3040-7560

Для предотвращения агглютинации или слияния липидов и/или везикул в результате лиофилизации может оказаться полезным включение добавок, которые предотвращают такое слияние или агглютинацию. Добавки, которые могут быть полезными, включают сорбит, маннит, хлорид натрия, глюкозу, трегалозу, поливинилпирролидон (ПВП) и поли(этиленгликоль) (ПЭГ), например, ПЭГ 400. Эти и другие добавки описаны в литературе, например в Фармакопее США, USP XXII, NF XVII, Фармакопее США, Национальном формуляре, United States Pharmacopeial Convention Inc., 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, Md. 20852, описания которых включены в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

Термины «стабильный» и «стабилизированный» в применении к везикулам означают,

что везикулы, по существу, устойчивы к деградации, включая, например потерю везикулами структуры или инкапсулированного газа или газообразного предшественника, в течение полезного периода времени. Термины «стабильный» и «стабилизированный» применительно к водным композициям по настоящему изобретению, содержащим SapC/липидные везикулы (до лиофилизации или после восстановления лиофилизированного порошка), означают отсутствие значительной потери содержания или чистоты белка или липида фосфатидилсерина и существенных изменений физических свойств. Термины «стабильный» и «стабилизированный» применительно к настоящим лиофилизированным порошковым композициям означают, что при восстановлении водой для инъекций не происходит значительной потери содержания или чистоты белка и фосфатидилсеринового липида и значительных изменений физических свойств.

Раковые заболевания, которые поддаются лечению с помощью композиций по настоящему изобретению, включают, например, любые солидные опухоли или неврологический рак, например, рак простаты, рак печени, рак легких, рак поджелудочной железы, почечно-клеточную карциному, рак молочной железы, рак яичников, рак яичек, эпендимому, раковые заболевания головного мозга, такие как глиомы высокой степени злокачественности (HGG), включая мультиформную глиобластому (GBM), и раковые заболевания желудочно-кишечного тракта (GI), включая рак аппендикса и колоректальный рак. Композиции полезны для лечения метастатических опухолей независимо от типа первичной опухоли или органа, в котором она метастазирует. Метастатическая опухоль может возникать из множества первичных типов опухолей, включая, помимо прочего, опухоли простаты, толстой кишки, легких, молочной железы и печени. Термины «рак» и «новообразование» могут включать злокачественные новообразования различных систем органов, например, поражающие легкие, молочную железу, щитовидную железу, лимфоидную ткань, желудочно-кишечный тракт или мочеполовой тракт, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как, в наибольшей степени, рак толстой кишки, почечно-клеточная карцинома, рак простаты и/или опухоли яичек, немелкоклеточная карцинома легких, рак тонкой кишки и рак пищевода. Термин «карцинома» известен в данной области и относится к злокачественным новообразованиям эпителиальных тканей или тканей эндокринных органов, включая карциномы дыхательной системы, карциномы желудочно-кишечной системы, карциномы мочеполовой системы, карциномы яичек, карциномы молочной железы, карциномы простаты, карциномы эндокринной системы и меланомы. Примеры карцином включают карциномы, образующиеся из ткани шейки матки, легких, простаты, молочной железы, головы и шеи, толстой кишки и яичников. Этот термин также включает карциносаркомы, которые включают злокачественные опухоли, состоящие из карциноматозных и саркоматозных тканей. «Аденокарцинома» относится к карциноме, происходящей из железистой ткани или ткани, в которой опухолевые клетки образуют распознаваемые железистые структуры. Более подробную информацию можно найти, например, в патенте США № 7,834,147, который включен в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

«Пациент» или «субъект» относится к животному, включая млекопитающее, предпочтительно человека.

Терапевтически эффективная доза или количество композиции представляет собой количество, используемое для лечения рака у пациента. Как правило, единичная терапевтически эффективная доза композиции по настоящему изобретению может

содержать количество SapC (или его производного) в диапазоне от примерно 0,01 до 30 мг/кг веса тела, предпочтительно от примерно 0,05 до 20 мг/кг веса тела, более предпочтительно примерно от 0,1 до 15 мг/кг веса тела и даже более предпочтительно примерно от 0,5 до 10 мг/кг. Например, количество SapC в единичной внутривенной дозе может составлять примерно 0,7 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,8 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,8 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,2 мг/кг, 3,6 мг/кг или более. Конкретный пациент может получить заданный уровень дозы за одно или несколько начальных введений и другой (более низкий или более высокий) уровень в дальнейших введениях. Доставка может осуществляться любым подходящим для инъекции способом, например, внутривенным, внутриаартериальным, внутрикожным, внутримышечным, внутрисердечным, внутричерепным, подкожным или внутрибрюшинным. Обычно композицию по настоящему изобретению восстанавливают в стерильной воде для инъекций и доставляют путем внутривенной инфузии из пакета для внутривенного введения, содержащего изотонический носитель, такой как физиологический раствор, PBS или 5 мас.% декстрозы (D5W). Более подробную информацию относительно путей введения можно найти, например, в патенте США № 7,834,147.

Введение можно осуществлять, по меньшей мере, один раз в сутки в течение некоторого количества дней подряд, например, в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более дней подряд, или можно осуществлять, например, через день или 3 раза в неделю, или один раз в 7 ± 3 дня, или один раз в 14 ± 3 дня, или один раз в 28 ± 3 дня. Расчет времени введения можно начинать с одного из этих графиков, а после подходящего периода лечения можно перейти на другой график более или менее частого введения. Весь период лечения может быть завершен, например, за восемь, двенадцать или шестнадцать недель или может продолжаться до шести месяцев, но более предпочтительно может продолжаться до тех пор, пока у пациента не появятся признаки того, что лечение приносит пользу. Например, график дозирования может быть следующим:

Цикл 1:

неделя 1: по одной дозе в каждый из дней 1-5;

неделя 2: 3 раза в неделю через день, например по одной дозе в дни 8, 10 и 12;

недели 3 и 4: по одной дозе каждую неделю (каждые $7 (+/- 3)$ дней);

Цикл 2: одна доза в течение недели 5; и

любой последующий цикл: одна доза через $28 (+/- 3)$ дней после введения последней предыдущей дозы.

Молярное отношение полипептида SapC к липиду фосфатидилсерина в композиции по изобретению может находиться в диапазоне от 1:2 до 1:50, например, от 1:5 до 1:30 или от 1:8 до 1:20, или от 1:11 до 1:13. Подходящие молярные отношения включают, без ограничения, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14 и 1:15. Массовое отношение полипептида к липиду фосфатидилсерина находится в диапазоне от примерно 1:0,18 до примерно 1:4,5, или от примерно 1:0,45 до примерно 1:2,7, или от примерно 1:0,72 до примерно 1:1,81, или от примерно 1:1 до примерно 1:1,2. Очевидно, что предпочтительное отношение полипептида к липиду в композиции по настоящему изобретению может зависеть от определенных факторов, таких как, без ограничения, тип клетки-мишени и путь доставки.

Полезную справочную информацию и технические детали можно найти в патентах США №№ 7,834,147 и 9,271,932, которые включены в настоящее описание в всей своей полноте в качестве ссылки.

Композиции и способы дополнительно подтверждены информацией, представленной в приведенных ниже примерах. Следует понимать, что варианты осуществления,

описанные в примерах, являются просто иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, которое ограничено только прилагаемой формулой изобретения.

ПРИМЕРЫ

5 Материалы

У коммерческих поставщиков приобретали следующие реагенты: дигидрат цитрата натрия, безводную лимонную кислоту, глицин, одноосновный моногидрат фосфата натрия (EMD), двухосновный гептагидрат фосфата натрия (Thermo Scientific), трис (гидроксиметил)аминометан («Трис»; JT Baker), L-гистидин, хлорид натрия, воду
 10 NuClone™ (Thermo Scientific), гидроксид натрия, безводную D-трегалозу (VWR International), D(+) дигидрат трегалозы (Spectrum), сахарозу (BDH Chemicals), маннит (BDH Chemicals), 0,9% хлорид натрия, трет-бутанол (Sigma Aldrich), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серин (натриевая соль DOPS) (Avanti Polar Lipids).

Сапозин С («SapC») получали стандартными методами с помощью рекомбинантной
 15 экспрессии в клетках *E. coli*.

Пример 1. Определение, каким образом выбранные буферные агенты влияют на стабильность композиций, содержащих SapC.

Для определения, каким образом буферные агенты влияют на стабильность SapC, композиции SapC готовили в выбранных буферных агентах, приведенных в таблицах
 20 1 и 2, и анализировали методами дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и кругового дихроизма (CD).

Методы

Были приготовлены композиции, приведенные в Таблице 1 и Таблице 2.

Таблица 1: Композиции, приготовленные для анализа DSC

25

UID	Описание
75312-F9	5 мг/мл SapC, 10 mM цитрат, pH 6
75312-F10	5 мг/мл SapC, 10 mM фосфат, pH 7
75312-F11	5 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 7.5
75312-F12	5 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 8
30 75312-F13	5 мг/мл SapC, 10 mM фосфат, pH 7,5, 1,68 мас.% NaCl
75312-F14	5 мг/мл SapC, 50 mM фосфат, pH 7,5, 1,20% (мас./об.) NaCl
75312-F15	5 мг/мл SapC, 10 mM глицин, pH 9

Таблица 2: Композиции, приготовленные для анализа CD

35

UID	Описание
75312-F1	1 мг/мл SapC, 10 mM цитрат, pH 6
75312-F2	1 мг/мл SapC, 10 mM фосфат, pH 7
75312-F3	1 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 7,5
75312-F4	1 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 8
75312-F5	1 мг/мл SapC, 10 mM фосфат, 1,68% (мас./об.) NaCl, pH 7,5
40 75312-F6	1 мг/мл SapC, 50 mM фосфат, 1,20% (мас./об.) NaCl, pH 7,5
75312-F7	1 мг/мл SapC, 10 mM глицин, pH 9

Измерения DSC выполняли с помощью калориметра MicroCal™ VP-DSC (Northampton, MA). Параметры цикла включали диапазон температур от 10 до 110°C, скорость сканирования 60°C в час и период фильтрации 16 секунд. Образцы предварительно
 45 уравнивали в течение 15 минут перед каждым сканированием. Термограммы обрабатывали с использованием дополнительного модуля калориметра MicroCal™ VP-DSC для Origin версии 7. Расплав DSC позволяет обнаружить разворачивание белка путем отслеживания изменения энтальпии, связанного с этим событием. Разворачивание

белка обычно является экзотермическим процессом и выделяется в виде пика при чтении термограммы, причем вершина означает переход, при котором развернулась половина молекул белка. Высокая температура плавления (T_m) означает высокую внутреннюю конформационную стабильность.

5 Измерения CD выполняли с помощью спектрополяриметра Chirascan™-plus (Leatherhead, UK) с 4-позиционным регулятором температуры Пельтье. Спектр каждого образца в дальней УФ-области получали в диапазоне длин волн 180-260 нм при 10°C с использованием кюветы с длиной оптического пути 0,1 см. Спектры соответствующих контрольных образцов вычитали из спектров соответствующих тестовых образцов.

10 Процент вторичной структуры оценивали с помощью программного обеспечения CDNN, поставляемого с прибором. Было определено, что образцы с концентрацией SapC 1 мг/мл необходимо разбавить, чтобы избежать насыщения при более низких длинах волн спектров CD. Поэтому перед измерениями CD выполняли 6-кратное разведение каждого образца.

15 Результаты

Фиг. 1 представляет собой график, демонстрирующий результаты анализа DSC, полученные для образца 75312-F10. На термограмме образца 75312-F10, а также всех протестированных образцов (данные не показаны) отсутствовал переход, ожидаемый для разворачивания белка. Не желая быть связанным какой-либо конкретной теорией,
20 было выдвинуто предположение, что либо (1) белок SapC не имеет третичной структуры (структур), либо (2) белок SapC не разворачивается даже при максимальной температуре, 110°C.

Фиг. 2 представляет собой график, демонстрирующий результаты анализа CD, полученные для образцов, приведенных в таблице 2. Спектры CD всех образцов имеют
25 минимумы примерно при 208 и 220 нм, что является характеристикой, свидетельствующей о значительном содержании α -спирали. Анализ спектров выявил зависимость величин спектров от величины pH следующего вида: pH 7,0 > 7,5 \approx 6,0 > 8,0 > 9,0.

Процент вторичной структуры для каждого образца оценивали по спектрам CD методами, известными в данной области техники, которые представлены в таблице 3.
30 Фиг. 3 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание α -спирали и случайного клубка, оцененное по результатам анализа CD, полученным для образцов, приведенных в таблице 2. Примечательно, что наибольшее и наименьшее количество α -спиралей коррелировало с pH образца, с наибольшим количеством в образце 75312-F2 (pH 7) и наименьшим - в образце 75312-F7 (pH 9). Эти данные свидетельствуют о том,
35 что SapC, вероятно, сохраняет активность, что следует из факта сохранения компонентов со вторичной структурой при хранении в фосфате при pH 7 или в Трис при pH 7,6. Эти данные также указывают на то, что изменение концентрации буфера, в частности 10 или 50 mM фосфата (сравнение 75312-F5 с 75312-F6), при сохранении постоянной тоничности, не выявили различий во вторичной структуре SapC.

40 Таблица 3: Оцененный процент вторичной структуры в каждой композиции

UID	Спираль	Анти-параллельный β -лист	Параллельный β -лист	β -поворот	Случайный клубок	Общая сумма
75312-F1	64,9	3,2	3,3	12,5	14,0	97,9
75312-F2	83,4	1,4	1,6	9,7	7,2	103,4
75312-F3	69,6	2,7	2,8	11,8	12,5	99,4
75312-F4	46,6	5,7	5,8	14,9	23,1	96,2
75312-F5	45,4	6,0	6,0	15,1	23,5	96,0
75312-F6	47,0	5,7	5,7	14,9	22,8	96,1
75312-F7	21,0	13,6	13,0	19,6	42,1	109,4

Пример 2. Определение того, каким образом выбранные буферные агенты (и концентрации) влияют на стабильность и чистоту композиций SapC, хранившихся при 60°C

Для определения, каким образом различные буферные агенты влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC, композиции SapC готовили в выбранных буферных агентах, приведенных в таблице 4, хранили при 60°C и анализировали по внешнему виду, общему содержанию белка и чистоте содержащегося белка.

Методы

Готовили композиции, перечисленные в таблице 4. Некоторые образцы замораживали сразу после приготовления (t=0 дней) и хранили при -70°C до момента выполнения анализа; другие образцы перед замораживанием хранили в течение 10 дней при 60°C (t=10 дней) и хранили при -70°C до момента выполнения анализа. Затем замороженные образцы размораживали до комнатной температуры и анализировали следующие свойства: (1) внешний вид, оцениваемый путем визуальной характеристики жидкости при ярком свете для определения прозрачности, цвета и наличия любых твердых частиц в образце; (2) pH, определяемый с помощью pH-метра; (3) общее содержание белка, определяемое количественно с помощью УФ-анализа при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции 0,395 мг⁻¹ мл см⁻¹; (4) чистоту содержащегося белка, в частности процентное содержание полноразмерного SapC в образце и присутствие (и концентрацию) продуктов разложения SapC, которую оценивали методами эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ с обращенной фазой и ион-эксклюзионной ВЭЖХ. Эксклюзионная ВЭЖХ, ВЭЖХ с обращенной фазой и ион-эксклюзионная ВЭЖХ являются хроматографическими методами, которые позволяют разделять аналит по размеру, гидрофобности и вариантам заряда, соответственно.

Таблица 4: Список композиций

UID	Описание
183-001-01-095-F1	2 мг/мл SapC, 10 mM гистидина, pH 6
183-001-01-095-F2	2 мг/мл SapC, 50 mM гистидина, pH 6
183-001-01-095-F3	5 мг/мл SapC, 10 mM гистидина, pH 6
183-001-01-095-F4	5 мг/мл SapC, 50 mM гистидина, pH 6
183-001-01-095-F5	2 мг/мл SapC, 10 mM фосфата, pH 6,8
183-001-01-095-F6	2 мг/мл SapC, 50 mM фосфата, pH 6,8
183-001-01-095-F7	5 мг/мл SapC, 10 mM фосфата, pH 6,8
183-001-01-095-F8	5 мг/мл SapC, 50 mM фосфата, pH 6,8
183-001-01-095-F9	2 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 7,6
183-001-01-095-F10	2 мг/мл SapC, 50 mM Трис, pH 7,6
183-001-01-095-F11	5 мг/мл SapC, 10 mM Трис, pH 7,6
183-001-01-095-F12	5 мг/мл SapC, 50 mM Трис, pH 7,6

Результаты

Внешний вид образцов суммирован в Таблице 5. При t=0 дней образцы 183-001-01-095-F2, -F4, -F5, -F6 и -F7 не содержали видимых частиц, а образцы 183-001-01-095-F1, -F3, -F8, -F9, -F10, -F11 и -F12 были в основном прозрачными с незначительным количеством частиц. После инкубации при 60°C в течение 10 дней все образцы содержали незначительное количество частиц, а забуференные фосфатом образцы 183-001-01-095-F5, -F6 и -F8 имели «длинные» частицы. Кроме того, некоторые образцы, содержащие гистидин и фосфат, приобрели легкий желтый оттенок, особенно образцы 183-001-01-095-F3, -F4, -F7 и -F8.

Таблица 5: Внешний вид каждой композиции в момент t=0 и через t=10 дней

UID	t=0 дней	t=10 дней
183-001-01-095-F1	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F2	Прозрачный, бесцветный, не содержит видимых частиц	Прозрачный со светло-желтым оттенком, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F3	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный со светло-желтым оттенком, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F4	Прозрачный, бесцветный, не содержит видимых частиц	Прозрачный со светло-желтым оттенком, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F5	Прозрачный, бесцветный, не содержит видимых частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество длинных частиц
183-001-01-095-F6	Прозрачный, бесцветный, не содержит видимых частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество длинных частиц
183-001-01-095-F7	Прозрачный, бесцветный, не содержит видимых частиц	Прозрачный со светло-желтым оттенком, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F8	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный со светло-желтым оттенком, незначительное количество длинных частиц
183-001-01-095-F9	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F10	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F11	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц
183-001-01-095-F12	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц	Прозрачный, бесцветный, незначительное количество частиц

Значение рН каждого образца представлено в таблице 6. Значение рН образцов, забуференных фосфатом (183-001-01-095-F5, -F6, -F7, -F8), было сдвинуто в щелочную сторону относительно их целевого значения рН=6,8 в оба момента времени.

Примечательно, что значения рН образцов, забуференных 10 мМ фосфатом (183-001-01-095-F5 и -F7), были смещены больше, чем значения рН образцов, забуференных 50 мМ фосфатом (183-001-01-095-F6 и -F8). Во всех образцах, забуференных гистидином (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 и -F4) или Трисом (183-001-01-095-F9, -F10, -F11 и -F12), исходное значение рН сохранялось с точностью до 0,1 единицы рН.

Таблица 6: Значение рН каждого образца в момент t=0 и через t=10 дней

UID	t= 0 дней	t=10 дней
183-001-01-095-F1	6,12	6,11
183-001-01-095-F2	5,98	5,96
183-001-01-095-F3	6,22	6,25
183-001-01-095-F4	6,01	6,01
183-001-01-095-F5	7,31	7,29
183-001-01-095-F6	7,10	7,09
183-001-01-095-F7	7,25	7,30
183-001-01-095-F8	7,08	7,09
183-001-01-095-F9	7,55	7,57
183-001-01-095-F10	7,54	7,54
183-001-01-095-F11	7,59	7,60
183-001-01-095-F12	7,52	7,53

Общее содержание белка в каждом из образцов представлено в таблице 7. В момент t=0 во всех образцах наблюдали концентрации белка, близкие к целевым значениям 2 или 5 мг/мл. Однако через t=10 дней в большинстве образцов концентрация белка увеличилась. Эти завышенные числа, вероятно, являются артефактом спектрального рассеяния из-за увеличения количества крупных частиц в образцах. Для количественной оценки увеличения рассеяния измеряли сканы оптической плотности (от 200 до 400 нм) для каждого образца, чтобы оценить степень увеличения рассеяния при хранении. Фиг.4 представляет собой график, демонстрирующий значение оптической плотности каждого

образца при длине волны 310 нм, при которой отсутствует значительное поглощение сигнала (обратите внимание, что образец 183-001-01-095-F11 не анализировали). Образцы, забуференные гистидином при pH 6 (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 и F4), и образцы, забуференные фосфатом при pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 и F8), показали увеличенное рассеяние через 10 дней. Примечательно, что образцы 183-001-01-095-F9, -F10 и -F12, забуференные Трисом при pH 7,6, показали минимальное увеличение рассеяния через 10 дней.

Таблица 7: Общее содержание белка (мг/мл) в композициях в момент t=0 и через t=10 дней

UID	t= 0 дней	t=10 дней
183-001-01-095-F1	2,01	2,34
183-001-01-095-F2	2,08	3,12
183-001-01-095-F3	4,82	5,57
183-001-01-095-F4	4,97	6,70
183-001-01-095-F5	2,08	2,36
183-001-01-095-F6	2,13	2,52
183-001-01-095-F7	4,99	5,53
183-001-01-095-F8	5,00	5,92
183-001-01-095-F9	2,07	2,09
183-001-01-095-F10	2,03	2,09
183-001-01-095-F11	5,05	5,18
183-001-01-095-F12	4,99	5,22

Чистоту SapC в образцах оценивали методами эксклюзионной ВЭЖХ, ВЭЖХ с обращенной фазой и ион-эксклюзионной ВЭЖХ. Чистоту SapC в образцах количественно определяли в виде процента содержания белка, обнаруженного в пике элюирования, содержащем полноразмерный SapC. Фиг.5 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в момент t=0 и через 10 дней при 60°C. Все образцы через 10 дней показали чистоту SapC более 95%, определенную методом эксклюзионной ВЭЖХ. В частности, образцы, забуференные гистидином при pH 6 (183-001-01-095-F1, -F2, -F3 и -F4), и образцы, забуференные фосфатом при pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 и -F8), которые показали увеличенное рассеяние при OD 310 нм, как и ожидалось, содержали частицы с молекулярной массой более высокого порядка (т.е. агрегаты); однако метод эксклюзионной ВЭЖХ не выявил в этих образцах наличие таких агрегатов. Если бы эти предполагаемые агрегаты были слишком большими для прохождения через колонку, тогда уменьшилась бы кажущаяся концентрация белка (судя по площади хроматографического пика). Это также не наблюдалось, поскольку восстановление пика основного компонента SapC в этих образцах было высоким даже через 10 дней. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, заявители отмечают, что возможное объяснение этих результатов заключается в том, что твердые частицы, наблюдаемые в F1-F8, не содержат или содержат незначительное количество SapC или фрагментов SapC.

Фиг.6 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты SapC в момент t=0 и через 10 дней при 60°C. Все образцы показали некоторую степень снижения чистоты SapC через 10 дней, измеренную методом ВЭЖХ с обращенной фазой. Образцы, забуференные фосфатом с pH 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 и -F8), показали наибольшее снижение чистоты SapC.

Фиг.7 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в момент t=0 и через 10 дней при 60°C. Все

образцы показали некоторую степень снижения чистоты SapC через 10 дней, измеренную методом ион-экслюзионной ВЭЖХ. Как и в случае, когда измерения выполняли методом ВЭЖХ с обращенной фазой (см. выше), образцы, забуференные фосфатом с рН 6,8 (183-001-01-095-F5, -F6, -F7 и -F8), показали наибольшее снижение чистоты SapC.

5 В сумме эти данные показывают, что образцы, содержащие Трис при рН 7,6, имеют более высокую стабильность и чистоту по сравнению с образцами, содержащими гистидин при рН 6 или фосфат при рН 6,8.

10 **Пример 3. Определение, каким образом выбранные концентрации цитрата при рН 6,2 влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC, подвергнутых воздействию температуры 60°C.**

Для определения, каким образом цитрат влияет на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC, различные композиции SapC готовили в цитрате при рН 6,2, которые хранили при 60°C и анализировали их внешний вид, рН, содержание белка, используя хроматографические методы.

15 **Методы**

Образцы композиций, приведенные в таблице 8, отбирали в момент t=0 (сразу после приготовления) и после хранения при 60°C в течение 10 дней (t=10 дней), затем замораживали и хранили при -70°C до момента проведения анализа. Замороженные композиции оттаивали до комнатной температуры и определяли следующие свойства, как описано в Примере 2: внешний вид, рН, общее содержание белка и чистоту содержащегося белка.

Таблица 8: Цитрат-содержащие композиции

UID	Описание
82014-F1	2 мг/мл SapC, 10 мМ цитрат, рН 6,2
82014-F2	2 мг/мл SapC, 50 мМ цитрат, рН 6,2
82014-F3	5 мг/мл SapC, 10 мМ цитрат, рН 6,2
82014-F4	5 мг/мл SapC, 50 мМ цитрат, рН 6,2
82014-цитрат контроль 1	10 мМ цитрат, рН 6,2
82014-цитрат контроль 2	50 мМ цитрат, рН 6,2

30 Внешний вид и рН каждого образца приведены в таблице 9. Все образцы представляли собой прозрачные и бесцветные жидкости в оба момента времени. Уровень рН всех образцов сохранялся в пределах 0,2 единицы рН от исходного значения рН через 10 дней хранения при 60°C; однако исходное значение рН всех образцов было более щелочным, чем целевое значение рН 6,2.

35 **Таблица 9: Внешний вид и значение рН каждого образца в момент t=0 и через t=10 дней**

Образец #	Временная точка	Внешний вид	рН
82014-F1	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,62
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,63
82014-F2	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,32
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,26
82014-F3	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,71
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,92
82014-F4	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,31
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,32
82014-цитрат контроль 1	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,48
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,64
82014-цитрат контроль 2	t=0	Прозрачный бесцветный раствор	6,29
	t=10	Прозрачный бесцветный раствор	6,31

Фиг. 8 представляет собой график, демонстрирующий оптическую плотность каждой композиции из Таблицы 8 при анализе при 310 нм в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C . Ни одна композиция не показала значительного увеличения оптической плотности при 310 нм через 10 дней.

5 Фиг.9 представляет собой график, демонстрирующий измерение методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C . В этом измерении все композиции показали снижение чистоты SapC через 10 дней.

10 Фиг.10 представляет собой график, демонстрирующий измерение методом эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C . Все композиции не показали заметных изменений чистоты SapC через 10 дней.

15 Фиг.11 представляет собой график, демонстрирующий измерение методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в композициях из Таблицы 8 в момент $t=0$ и через 10 дней при 60°C . В этом измерении все образцы показали снижение чистоты SapC через 10 дней.

В целом, эти данные показывают, что образцы, содержащие 2 или 5 мг/мл SapC и 10 или 50 мМ цитрата при целевом значении $\text{pH}=6,2$ (фактическом значении pH , доходящем до 6,64), были сопоставимыми по стабильности и чистоте в течение 10 дней при 60°C .
20 Основываясь на этих данных и данных предыдущих примеров, потенциальные буферные агенты для композиций, содержащих SapC, включают, без ограничения, цитрат с приблизительным значением pH 6,2 и Трис с приблизительным значением pH 7,6.

Пример 4. Определение стабильности композиций, содержащих SapC и 25 мМ Трис, pH 7,2, после воздействия механического или термического стресса

25 Для количественной оценки стабильности композиций, содержащих SapC и 25 мМ Трис, pH 7,2, после воздействия механического или термического стресса, композиции подвергали механическому или термическому стрессу и анализировали внешний вид, pH и общее содержание белка.

Методы

30 Готовили композицию 183-001-01-220-F1, содержащую 5 мг/мл SapC, 25 мМ Трис, pH 7,1-7,2, и ее образцы подвергали воздействию либо стресса, возникающего при замораживании-оттаивании, либо стрессу перемешивания. Для каждого образца анализировали следующие свойства, как описано в Примере 2: внешний вид, pH и общее содержание белка.

35 Для стресс-тестирования путем замораживания-оттаивания образцы разделяли на аликвоты по 1,3 мл в 5 мл флаконах из PETG и подвергли пяти циклам замораживания-оттаивания. Для каждого цикла флаконы замораживали при 70°C и оттаивали до комнатной температуры. После каждого оттаивания содержимое каждого флакона перемешивали, осторожно переворачивая примерно 5 раз, прежде чем возвращать в
40 температуру -70°C для следующего цикла.

Для стресс-тестирования путем перемешивания образцы разделяли на аликвоты по 1,3 мл в восьми флаконах из PETG. Четыре флакона перемешивали на орбитальном шейкере (Thermo Scientific, модель № 2309) при 220 об/мин в течение 15 или 24 часов при температуре окружающей среды. Параллельно с этим оставшиеся четыре флакона помещали на стол рядом с шейкером в качестве стационарных контролей. Через 15 и
45 24 часа анализировали два флакона из тестовой группы и два из контрольной группы.

Результаты

Все образцы представляли собой прозрачные и бесцветные жидкости (данные не

показаны).

Значение рН каждого образца показано на фиг. 12. Значение рН у всех образцов сохранялось в пределах 0,1 единицы рН от исходного значения рН.

Общее содержание белка в каждом из образцов показано на фиг. 13. Содержание белка во всех подвергнутых стрессу образцах находилось в пределах 3 процентов от общего содержания белка в не подвергнутом стрессу образце в момент $t=0$.

В целом, испытанные композиции, содержащие SapC и 25 мМ Трис при рН 7,1 (фактический рН составлял 7,1 при $t=0$; целевой рН составлял 7,2), продемонстрировали стабильность после воздействия механического или термического стресса согласно оценкам их внешнего вида, рН и общего содержания белка.

Пример 5. Определение, каким образом различные концентрации трет-бутанола (ТВА) влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC и диолеилфосфатидилсерин (DOPS).

Трет-бутанол (или трет-бутиловый спирт; ТВА) использовали в качестве органического растворителя для растворения DOPS перед его включением в различные композиции SapC. Для определения, каким образом различные концентрации ТВА влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC, готовили композиции, содержащие концентрации ТВА, приведенные в таблице 10, фильтровали и анализировали их внешний вид, общее содержание белка и содержание DOPS.

20 Методы

Готовили композиции, приведенные в таблице 10, и оценивали до и после стандартной стерильной фильтрации через фильтр 0,2 мкм. Все проценты приведены по массе. Внешний вид и общее содержание белка в каждой композиции анализировали, как описано в Примере 2. Общее содержание DOPS в каждой композиции анализировали с помощью системы ВЭЖХ - детекторы светорассеяния по испарению (ELSD).

Таблица 10: Композиции, содержащие ТВА

UID	Описание
183-001-01-050-F1	2,3 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 9% трегалозы, 30% ТВА, 50 мМ Трис, рН 7,2
183-001-01-050-F2	2,3 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 9% трегалозы, 25% ТВА, 50 мМ Трис, 7,2
183-001-01-050-F3	2,3 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 9% трегалозы, 20% ТВА, 50 мМ Трис, 7,2
183-001-01-050-F4	2,3 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 9% трегалозы, 15% ТВА, 50 мМ Трис, 7,2

35 Результаты

Внешний вид каждого образца описан в таблице 10. Все образцы представляли собой прозрачные и бесцветные жидкости как до, так и после фильтрации.

Таблица 11: Внешний вид каждого образца до и после фильтрации

UID	До фильтрации	После фильтрации
183-001-01-050-F1	Прозрачный бесцветный с незначительным количеством частиц	Прозрачный бесцветный без частиц
183-001-01-050-F2	Прозрачный бесцветный без частиц	Прозрачный бесцветный без частиц
183-001-01-050-F3	Прозрачный бесцветный без частиц	Прозрачный бесцветный без частиц
183-001-01-050-F4	Прозрачный бесцветный без частиц	Прозрачный бесцветный без частиц

Общее содержание белка в каждом образце представлено в Таблице 12. Во всех образцах отсутствовали значительные изменения в содержании белка до и после фильтрации.

Таблица 12: Общее содержание белка (мг/мл) в каждой композиции до и после

5 фильтрации

UID	До фильтрации	После фильтрации
183-001-01-050-F1	2,25	2,3
183-001-01-050-F2	2,59	2,55
183-001-01-050-F3	2,21	2,26
183-001-01-050-F4	2,49	2,51

Общее содержание DOPS в каждом образце представлено в таблице 13. Композиции не показали значительного изменения содержания DOPS до и после фильтрации.

10 Таблица 13: Общее содержание DOPS (мг/мл) в каждой композиции до и после фильтрации

UID	До фильтрации	После фильтрации
183-001-01-050-F1	3,06	3,10
183-001-01-050-F2	2,98	3,04
183-001-01-050-F3	2,97	2,97
183-001-01-050-F4	3,00	2,94

15 В сумме эти данные показывают, что образцы, содержащие от 15 до 35 процентов ТВА, имели сходный внешний вид, содержание белка и содержание DOPS до и после фильтрации.

20 **Пример 6. Определение, каким образом определенные вспомогательные вещества и буферные агенты влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC и DOPS**

25 Для определения каким образом определенные вспомогательные вещества и буферные агенты влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC, готовили композиции, приведенные в таблице 14, и оценивали стабильность и чистоту каждой композиции.

Методы

30 Готовили композиции, приведенные в Таблице 14, и аликвоты по 1,2 мл лиофилизировали в соответствии с процедурой лиофилизации, описанной в Таблице 15. Затем каждый лиофилизированный образец восстанавливали 1,2 мл очищенной воды NuClone™, и лиофилизированным лепешкам давали полностью раствориться.

35 Анализировали следующие свойства, как описано в Примере 2: внешний вид; общее содержание белка и чистоту содержащегося белка. Содержание влаги в каждом лиофилизированном образце определяли кулонометрическим методом. Процентное содержание ТВА в каждом образце определяли методом свободного пространства GC-MS. (ТВА в образцах - это то, что осталось от ТВА, используемого в качестве растворителя для DOPS после сублимации большей части ТВА из образцов в процессе лиофилизации.)

40 В дополнительном эксперименте образец каждой восстановленной композиции хранили при 50°C в течение 2 или 5 недель, и его стабильность оценивали по внешнему виду и чистоте содержащегося белка, анализируя, как описано в Примере 2, по чистоте, измеренной методом ВЭЖХ с обращенной фазой и по гранулометрическому составу. Размеры частиц в каждой восстановленной жидкости в момент t=0 и через t=5 недель определяли методом динамического светорассеяния с помощью прибора Malvern.

45 Таблица 14: Композиции, приготовленные для лиофилизации и восстановления

UID	Описание
76114-F1	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 9% сахарозы, 10 мМ Трис, pH 8
76114-F2	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 9% трегалозы, 10 мМ Трис, pH 8

76114-F3	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 4% маннита, 1% сахарозы, 10 мМ Трис, pH 8
76114-F4	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 9% сахарозы, 10 мМ Трис, pH 7,2
76114-F5	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 9% трегалозы, 10 мМ Трис, pH 7,2
76114-F6	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 4% маннита, 1% сахарозы, 10 мМ Трис, pH 7,2
76114-F7	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 9% сахарозы, 10 мМ гистидин, pH 6,5
76114-F8	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 8% трегалозы, 10 мМ гистидин, pH 6,5
76114-F9	0,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 4% маннита, 1% сахарозы, 10 мМ гистидин, pH 6,5

Таблица 15: Цикл лиофилизации, использованный для приготовления лиофилизированных композиций

Цель	Описание
Загрузка	Выдерживание при 5°C
Заморозка	Линейное изменение со скоростью 0,3°C/мин в течение 183 мин; Выдерживание при -50°C в течение 60 мин; Линейное изменение со скоростью 0,3°C/мин в течение 133 мин; Выдерживание при -10°C в течение 120 мин; Линейное изменение со скоростью 0,3°C/мин в течение 133 мин; Выдерживание при -50°C в течение 180 мин
Первичная сушка	Выдерживание при -50°C в течение 30 мин под давлением 8,1 Па (50 мТорр); Линейное изменение со скоростью 0,3°C/мин в течение 67 мин под давлением 8,1 Па (50 мТорр); Выдерживание при -40°C в течение 2400 мин под давлением 8,1 Па (50 мТорр)
Вторичная сушка	Линейное изменение со скоростью 0,5°C/мин в течение 120 мин под давлением 8,1 Па (50 мТорр); Выдерживание при 30°C в течение 480 мин под давлением 8,1 Па (50 мТорр)

Результаты

Внешний вид каждого образца описан в таблице 16. Все образцы, содержащие 9% сахарозы, имели частицы при восстановлении в момент $t=0$, в то время как все образцы, содержащие трегалозу, не содержали частиц, что является важным фактором для инъекционной композиции.

Таблица 16: Внешний вид лиофилизированной лепешки и восстановленной жидкости в момент $t=0$

UID	Лиофилизированная лепешка	Восстановленная жидкость в момент $t=0$
76114-F1	Белая легкая, немного растрескивается	Мутная, видны частицы; частицы осаждаются при центрифугировании
76114-F2	Белая легкая, немного растрескивается	Прозрачная бесцветная, без частиц
76114-F3	Белая легкая, немного растрескивается	Слегка мутная, без частиц
76114-F4	Белая легкая, немного растрескивается и уменьшается в размерах	Мутная, видны частицы; частицы осаждаются при центрифугировании
76114-F5	Белая легкая, немного растрескивается и уменьшается в размерах	Прозрачная бесцветная, без частиц
76114-F6	Белая легкая, немного растрескивается	Слегка мутная, без частиц
76114-F7	Белая легкая, немного растрескивается и уменьшается в размерах	Мутная, видны частицы; частицы осаждаются при центрифугировании
76114-F8	Белая легкая, немного растрескивается и уменьшается в размерах	Прозрачная бесцветная, без частиц
76114-F9	Белая легкая, немного растрескивается	Прозрачная бесцветная, без частиц

Общее содержание белка в каждом восстановленном образце представлено в Таблице 17.

Таблица 17: Общее содержание белка (мг/мл) в каждой восстановленной композиции в момент $t=0$, оцененное методом ВЭЖХ с обращенной фазой

UID	Общее содержание белка (мг/мл)	Процент восстановления SapC от теоретического
76114-F1	0,38	91
76114-F2	0,37	87
76114-F3	0,37	88
76114-F4	0,37	87
76114-F5	0,36	87

76114-F6	0,37	89
76114-F7	0,36	86
76114-F8	0,36	85
76114-F9	0,38	91

5 Чистота SapC в каждой восстановленной композиции в момент t=0 представлена в таблице 18.

Таблица 18: Чистота SapC в каждой композиции, оцененная методами ВЭЖХ с обращенной фазой и ион-эксклюзионной ВЭЖХ в момент t=0

UID	Чистота SapC в процентах, оцененная методом ВЭЖХ с обращенной фазой	Чистота SapC в процентах, оцененная методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ
76114-F1	93,2	96,1
76114-F2	93,2	95,9
76114-F3	93	96
76114-F4	93,6	96
76114-F5	93,5	95,8
76114-F6	93,6	96
76114-F7	93,6	95,8
76114-F8	91,8	95,8
76114-F9	93,9	95,9

10
15
20 Общее содержание ТВА в каждой восстановленной композиции представлено в Таблице 19. Все восстановленные композиции, содержащие 9% сахарозы (F1, F4 и F7), содержали более высокие уровни остаточного ТВА по сравнению с другими протестированными композициями.

Таблица 19: Процент ТВА в каждой восстановленной композиции в момент t=0

UID	Процент ТВА
76114-F1	2,4
76114-F2	1,9
76114-F3	0,3
76114-F4	2,3
76114-F5	1,7
76114-F6	0,2
76114-F7	2,2
76114-F8	1,8
76114-F9	0,3

Таблица 20: Содержание влаги в каждой лиофилизированной композиции

UID	Процент воды в момент t=0
76114-F1	0,3
76114-F2	0,4
76114-F3	2,1
76114-F4	0,4
76114-F5	0,3
76114-F6	1,1
76114-F7	0,4
76114-F8	0,3
76114-F9	1,0

35
40
45 Фиг. 14 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты и процента восстановления SapC в восстановленных композициях в момент t=0 и после хранения в течение 2 недель при 50°C. Чистота SapC через 2 недели при 50°C оставалась на уровне более 90 процентов во всех образцах, забуференных гистидином при рН 6,5 (76114-F7, F8 и -F9), а также в образце 76114-F6

(забуференном Трис при pH 7,2). Все другие образцы имели чистоту SapC менее 85% через 2 недели хранения при 50°C.

Лиофилизированный материал для образцов, содержащих 9% сахарозы (76114-F1, -F4, -F7), расплавился через 2 недели хранения при 50°C (данные не показаны), в то время как другие лиофилизированные образцы не имели значительных изменений внешнего вида через 2 недели хранения при температуре 50°C.

Фиг. 15 представляет собой график, демонстрирующий результаты динамического рассеяния света для образца 76114-F5 в момент $t=0$ (A) и через 5 недель (B) хранения при 50°C. Фиг. 16 представляет собой график, демонстрирующий результаты динамического рассеяния света для образца 76114-F6 в момент $t=0$ (A) и через 5 недель (B) хранения при 50°C. Композиции, содержащие 9% трегалозы (F2, F5, F8), показали наиболее однородное и воспроизводимое объемное распределение частиц согласно результатам динамического светорассеяния по сравнению со всеми другими испытанными композициями.

В сумме эти данные свидетельствуют о том, что трегалоза является предпочтительным сахарным наполнителем по сравнению с сахарозой и смесью маннита с сахарозой. И это несмотря на то, что композиции со смесями маннит/сахароза показали самый низкий процент ТВА среди всех протестированных композиций. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что композиции, содержащие SapC и DOPS, являются более стабильными в 10 мМ Трис при pH 6,5 или pH 7,2 по сравнению с 10 мМ Трис при pH 8.

Пример 7: Определение, каким образом выбранные концентрации SapC и DOPS (при постоянном молярном отношении SapC к DOPS) влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC и DOPS

Для определения каким образом различные концентрации SapC и DOPS влияют на стабильность и чистоту композиций, готовили композиции, приведенные в таблице 21, и оценивали стабильность и чистоту каждой композиции.

Методы

Готовили композиции, приведенные в таблице 21, и аликвоты по 1,2 мл лиофилизировали в соответствии со способом лиофилизации, описанным в примере 6. Затем каждый лиофилизированный образец восстанавливали 1,2 мл воды HyClone™, и лиофилизированным лепешкам давали полностью раствориться. Размеры частиц в каждом восстановленном образце в момент $t=0$ определяли методом динамического светорассеяния с помощью прибора Malvern.

Таблица 21: Композиции до лиофилизации

UID	Описание
76733-F1	4,2 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 10 мг/мл трегалозы, 25 мМ фосфат, pH 7,4
76733-F2	2.2 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 10 мг/мл трегалозы, 25 мМ фосфат, pH 7,4
76733-F3	1.3 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 10 мг/мл трегалозы, 25 мМ фосфат, pH 7,4
76733-F4	0.82 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 10 мг/мл трегалозы, 25 мМ фосфат, pH 7,4
76733-F5	0.42 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25% ТВА, 10 мг/мл трегалозы, 25 мМ фосфат, pH 7,4

Фиг.17 представляет собой график, демонстрирующий результаты динамического рассеяния света каждого восстановленного образца в момент $t=0$. Фиг. 18 представляет собой график, демонстрирующий изменение динамического рассеяния света каждого восстановленного образца с течением времени. Композиция с наивысшей концентрацией

SapC, 4,2 мг/мл, показала более высокий средний размер частиц по сравнению с композициями с 2,2 мг/мл или более низкими концентрациями SapC. Все восстановленные композиции сохраняли постоянный средний размер частиц в течение 4-часового периода, что свидетельствует о стабильном восстановленном продукте. Эти результаты наводят на предположение, что предпочтительная концентрация SapC меньше или равна 2,2 мг/мл SapC при молярном отношении SapC к DOPS 1:12.

Пример 8: Определение, каким образом различные концентрации маннита и трегалозы влияют на стабильность композиций, содержащих DOPS

Для определения, каким образом различные концентрации маннита и трегалозы влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих DOPS, готовили композиции, приведенные в таблицах 22 и 23, лиофилизовали их и восстанавливали в воде.

Методы

Готовили композиции, приведенные в Таблице 22, и аликвоты по 0,8 мл в 2 мл флаконах или аликвоты по 4 мл в 10 мл флаконах лиофилизовали в соответствии с процессом лиофилизации, описанным в Примере 6. Каждый флакон с лиофилизированным образцом восстанавливали водой HyClone™; лиофилизированным лепешкам давали полностью раствориться. Внешний вид лиофилизированных лепешек и процентное содержание ТВА в каждом восстановленном образце анализировали, как описано в Примере 6.

Таблица 22: Композиции до лиофилизации

UID	Описание
81494-F1	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 1,5% маннита
81494-F2	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 0,3% трегалозы
81494-F3	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 0,9% маннита
81494-F4	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 1,5% трегалозы
81494-F5	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 5% маннита
81494-F6	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 4% маннита, 1% трегалозы
81494-F7	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 3% маннита, 2% трегалозы
81494-F8	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 5% трегалозы
81494-F9	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 9% маннита
81494-F10	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 7,2% маннита, 1,8% трегалозы
81494-F11	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 5,4% маннита, 3,6% трегалозы
81494-F12	1,6 мг/мл DOPS, 10 мМ гистидин, pH 6, 9% трегалозы

Готовили композиции, приведенные в Таблице 23, и лиофилизовали в соответствии с процессом лиофилизации, описанным в Примере 6, с одной модификацией: температуру первичной сушки поддерживали на уровне -45°C, а не на уровне -40°C. Каждый лиофилизированный образец восстанавливали 1,2 мл воды HyClone™; лиофилизированным лепешкам давали полностью раствориться. Анализировали следующие свойства, как описано в Примере 6: внешний вид лиофилизированных лепешек, процентное содержание ТВА в каждом восстановленном образце и распределение частиц по размеру в каждом восстановленном образце.

Таблица 23: Композиции до лиофилизации, используемые в модифицированном процессе лиофилизации

UID	Описание
183-001-01-114-F1	2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, pH 6,2, 4% маннита, 1% трегалозы
183-001-01-114-F2	2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, pH 6,2, 3,5% маннита, 1,5% трегалозы
183-001-01-114-F3	2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, pH 6,2, 2% трегалозы
183-001-01-114-F4	2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, pH 6,2, 7,2% маннита, 1,8% трегалозы
183-001-01-114-F5	2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, pH 6,2, 6,3% маннита, 2,7% трегалозы

183-001-01-114-F6	2,2 мг/мл СаpС, 2,4 мг/мл DOPS, 10 мМ цитрат, рН 6,2, 5,4% маннита, 3,6% трегалозы
-------------------	--

Результаты

Таблицы 24 и 25 включают качественные наблюдения за лиофилизированными композициями, в том числе наличие или отсутствие образования лепешки и, в случае ее образования, целостность и качество лепешки.

Таблица 24: Внешний вид лиофилизированной лепешки композиций из Таблицы 22

UID	Результаты наблюдения
81494-F1	Лепешка не образуется
81494-F2	Лепешка не образуется
81494-F3	Лепешка не образуется
81494-F4	Лепешка не образуется
81494-F5	Лепешка не образуется
81494-F6	Лепешка не образуется
81494-F7	Компактная легкая лепешка без трещин
81494-F8	Компактная легкая лепешка без трещин
81494-F9	Компактная легкая лепешка без трещин
81494-F10	Компактная легкая лепешка без трещин
81494-F11	Компактная легкая лепешка без трещин
81494-F12	Компактная легкая лепешка с небольшой усадкой

Таблица 25: Внешний вид лиофилизированной лепешки композиций из Таблицы 23

UID	Результаты наблюдения
183-001-01-114-F1	В 4 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.
183-001-01-114-F2	В 4 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.
183-001-01-114-F3	В 2 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.
183-001-01-114-F4	В 4 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.
183-001-01-114-F5	В 3 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.
183-001-01-114-F6	В 4 из 4 флаконов была получена компактная легкая лепешка без трещин.

Фиг.19 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание ТВА в каждом восстановленном образце композиций из Таблицы 22.

Фиг.20 представляет собой график, демонстрирующий процентное содержание ТВА в каждом восстановленном образце композиций из Таблицы 23.

Фиг. 21 представляет собой график, демонстрирующий распределение частиц по размерам в трех повторных измерениях восстановленных жидкостей для некоторых композиций из Таблицы 23. На панели А показаны данные для 183-001-01-114-F1; на панели В показаны данные для 183-001-01-114-F4; на панели С показаны данные для 183-001-01-114-F5; и на панели D показаны данные для 183-001-01-114-F6. Подмножество композиций из Таблицы 22, а именно 81494-F7, -F8, -F9, -F10, -F11 и -F12, образовывали лиофилизированные лепешки высокого качества. При восстановлении в воде все шесть из этих композиций содержали менее 3 процентов ТВА. Восстановленные композиции 81494-F9 и 81494-F10 содержали самый низкий процент ТВА, менее 0,5 процента. Эти данные показывают, что компоненты композиций 81494-F7, F8, F9, F10 и F11 могут придавать полезные свойства как лиофилизированному осадку, так и восстановленному раствору.

Качество и целостность лиофилизированной лепешки были высокими у всех композиций, приготовленных с помощью модифицированного процесса лиофилизации (композиции в Таблице 23), и все эти композиции при восстановлении имели уровни ТВА ниже 0,5 процента. Эти результаты подтверждают предыдущие эксперименты, которые показали, что более высокий процент маннита коррелирует с более низким уровнем ТВА в восстановленных композициях. Однако композиции, содержащие

маннит, не имеют такого однородного и воспроизводимого распределения частиц по размеру, которое наблюдается в композициях, содержащих трегалозу в качестве единственного сахарного наполнителя. Следовательно, трегалоза является

предпочтительным сахарным наполнителем для композиций, содержащих SapC и DOPS.

5 **Пример 9. Определение, каким образом различные составы влияют на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC и DOPS**

Основываясь на результатах предыдущих примеров, был определен предпочтительный состав для фармацевтического продукта SapC-DOPS, который является следующим: 2,2 мг/мл SapC, 2,4 мг/мл DOPS (молярное соотношение SapC:

10 DOPS 1:12), 25 мМ Трис, pH 7,2, 5% трегалозы. Для определения, каким образом изменение pH и концентраций компонентов влияет на стабильность и чистоту композиций, содержащих SapC и DOPS, готовили и оценивали композиции, представленные в таблице 26.

Метод

15 Готовили композиции, приведенные в таблице 26. Аликвоты по 4 мл помещали во флаконы и лиофилизировали в соответствии с процессом лиофилизации, описанным в примере 6, с одной модификацией: время вторичной сушки составляло 25 часов вместо 15 часов. Лиофилизированные лепешки хранили при 50°C в течение 4 недель (или хранили при 25°C в течение 2 или 4 недель) перед анализом и восстановлением 1,2 мл

20 воды NuClone™. Анализировали следующие свойства, как описано в Примере 2: внешний вид, pH, общее содержание белка и чистоту содержания белка в восстановленных образцах. Анализировали следующие свойства, как описано в Примере 6: внешний вид лиофилизированных лепешек, процентное содержание ТВА в восстановленных образцах и распределение частиц по размерам в каждом восстановленном образце.

25 **Таблица 26: Композиции до лиофилизации**

UID	Описание
183-001-01-141-F1	2,2 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,2, 5% трегалозы
183-001-01-141-F2	3,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 6,8, 7,5% трегалозы
183-001-01-141-F3	1,0 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,6, 7,5% трегалозы
30 183-001-01-141-F4	3,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,6, 2,5% трегалозы
183-001-01-141-F5	1,0 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 6,8, 2,5% трегалозы
183-001-01-141-F6	2,2 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,2, 5% трегалозы
183-001-01-141-F7	2,2 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,2, 5% трегалозы
183-001-01-141-F8	3,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,6, 7,5% трегалозы
35 183-001-01-141-F9	1,0 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 7,2, 2,5% трегалозы
183-001-01-141-F10	3,4 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 6,8, 2,5% трегалозы
183-001-01-141-F11	1,0 мг/мл SapC, SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 мМ Трис, pH 6,8, 7,5% трегалозы

Результаты

Таблица 27 включает качественный мониторинг лиофилизированных композиций, хранящихся при 50°C в течение 4 недель, и восстановленных композиций,

40 приготовленных из хранившихся лиофилизированных композиций, которые впоследствии были сразу проанализированы. Величина pH каждого восстановленного образца представлена в таблице 28, а процентное содержание ТВА показано в таблице 29.

45 **Таблица 27: Внешний вид лиофилизированной лепешки, хранившейся при 50°C в течение 4 недель, и внешний вид восстановленной жидкости, приготовленной из хранившейся лепешки**

UID	Лиофилизированная лепешка	Восстановленный раствор
-----	---------------------------	-------------------------

	183-001-01-141-F1	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F2	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F3	Компактная легкая лепешка без трещин	Прозрачный
	183-001-01-141-F4	Компактная легкая лепешка без трещин	Мутный
5	183-001-01-141-F5	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F6	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F7	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F8	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F9	Компактная легкая лепешка без трещин	Слегка мутный
	183-001-01-141-F10	Компактная легкая лепешка без трещин	Мутный
10	183-001-01-141-F11	Компактная легкая лепешка без трещин	Прозрачный

Таблица 28: Величина pH каждой восстановленной композиции, приготовленной после хранения лиофилизированных образцов в течение 4 недель

UID	pH
183-001-01-141-F1	7,2
183-001-01-141-F2	6,8
183-001-01-141-F3	7,6
183-001-01-141-F4	7,6
183-001-01-141-F5	6,8
183-001-01-141-F6	7,2
183-001-01-141-F7	7,2
183-001-01-141-F8	7,6
183-001-01-141-F9	7,6
183-001-01-141-F10	6,8
183-001-01-141-F11	6,8

Таблица 29: Процент ТВА в каждой восстановленной композиции, приготовленной после хранения лиофилизированных образцов в течение 4 недель

UID	Процент ТВА
183-001-01-141-F1	1,85
183-001-01-141-F2	1,94
183-001-01-141-F3	1,81
183-001-01-141-F4	1,58
183-001-01-141-F5	1,62
183-001-01-141-F6	1,78
183-001-01-141-F7	1,74
183-001-01-141-F8	1,92
183-001-01-141-F9	1,38
183-001-01-141-F10	1,44
183-001-01-141-F11	1,79

Фиг. 22 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ВЭЖХ с обращенной фазой чистоты SapC в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение 2 или 4 недель.

Фиг. 23 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения методом ион-эксклюзионной ВЭЖХ чистоты SapC в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение 2 или 4 недель.

Фиг. 24 представляет собой график, демонстрирующий зависимость среднего размера частиц от времени в каждой восстановленной композиции, приготовленной из лиофилизированного порошка, который хранился при 25°C в течение 2 или 4 недель.

Приведенные выше данные относительно композиций из Таблицы 26 демонстрируют

следующее:

(1) лиофилизированные лепешки всех композиций восстанавливались почти сразу после добавления разбавителя;

5 (2) внешний вид всех лиофилизированных композиций не изменился после 4 недель хранения при 50°C;

(3) внешний вид восстановленных продуктов показал, что композиция, содержащая 2,2 мг/мл SapC, DOPS в количестве, обеспечивающем SapC:DOPS молярное отношение 1:12, 25 mM Tris, pH 7,2 и 5% трегалозы (предпочтительная композиция), имела приемлемо низкий уровень мутности;

10 (4) pH оставался стабильным во всех восстановленных композициях, выдерживаемых при 50°C в течение 2 или 4 недель;

(5) восстановленные композиции с более низким процентным содержанием трегалозы имели более низкий процент ТВА;

15 (6) средний остаточный ТВА предпочтительной композиции (n=3; F1, F6 и F7) после восстановления составлял 1,8 процента;

(7) композиции с более высоким процентным содержанием трегалозы показали более низкий средний размер частиц и композиции.

20 Основываясь на всех данных, приведенных в примерах 1-9, композиция с молярное отношением липида фосфатидилсерина к полипептиду в диапазоне от 8:1 до 20:1, содержащая трис-буфер, трегалозу и ТВА, обеспечивает предпочтительные физические и химические свойства композиции для клинического применения.

Пример 10. Оценка активности композиций, содержащих SapC и DOPS

Известно, что сапозин С в присутствии анионного фосфолипида (DOPS) активирует фермент глюкоцереброзидазу (GBA), катализирующий гидролиз цереброзида до 25 церемиды и глюкозы. Чтобы проверить эту функцию соединения SapC-DOPS *in vitro*, использовали человеческий рекомбинантный фермент GBA (R&D Systems, номер по каталогу: 7410-GNB-020) и в качестве подложки вместо цереброзида использовали 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозид или 4-MUG (Sigma, номер по каталогу: M3633). SapC-DOPS активирует rhGBA, который расщепляет 4-MUG до 4-метилумбеллиферона 30 (4-MU), который испускает флуоресцентный сигнал, и глюкозы.

В приведенном ниже примере было обнаружено, что образец положительного контроля имеет относительную эффективность 102% от эталонного стандарта (REF). (Удовлетворительным результатом этого анализа является относительная 35 эффективность, составляющая 70-160%.) Также был протестирован образец специфичности (SPEC), чтобы определить снижение активности в случае какого-либо повреждения SapC. Образец SPEC содержал SapC, обработанный при 70°C в течение 48 часов, затем смешанный с DOPS. Относительную эффективность образца SPEC не удалось определить из-за различий кривых. Однако вершина кривой наилучшего 40 соответствия для образца SPEC составила 79% от вершины кривой наилучшего соответствия для образца REF. Удовлетворительным результатом для специфичности был принят уровень <90%. Кроме того, использовались контроли, которые включали различные комбинации некоторых, но не всех, критических компонентов анализа. Среди них следует выделить: фермент плюс субстрат без SapC-DOPS (GBA+4 ME), фермент плюс субстрат плюс DOPS без SapC (только DOPS) и фермент плюс субстрат 45 плюс SapC без DOPS (только SapC). Ни один из этих контролей не давал значительного флуоресцентного сигнала, что свидетельствовало о том, что для активации фермента, расщепляющего субстрат, необходимы как SapC, так и DOPS.

Фиг.25 представляет собой график, демонстрирующий результаты тестирования

активности SapC-DOPS в ферментном анализе GBA.

Пример 11. Протокол лечения с помощью фармацевтической композиции, содержащей SapC и DOPS.

Пациенты в возрасте от 18 лет и старше с прогрессирующими солидными опухолями или рецидивирующими глиомами высокой степени злокачественности (HGG) были включены в Фазу 1 открытого клинического испытания по эскалации дозы композиции SapC/DOPS, обозначенной VXQ-350. Лиофилизированный продукт VXQ-350 (поставляемый в виде лиофилизированного порошка во флаконе) восстанавливают стерильной водой для инъекций с получением водного раствора, содержащего человеческого SapC в концентрации 2,2 мг/мл (+/-0,3 мг/мл); натриевую соль DOPS в концентрации 2,4 мг/мл (+/-0,4 мг/мл); 25 мМ Трис (+/-2 мМ), рН 7,2 (+/-0,4); трегалозу в количестве 5% (мас./об.) (+/-1%). В случае наличия трет-бутилового спирта, его содержание составляет менее 2 мас.%.
5
10

После исследования по эскалации дозы для дальнейшего изучения была выбрана доза VXQ-350, обеспечивающая 2,4 мг SapC на 1 кг массы тела. Протокол введения включает как минимум один курс лечения. Лечение может продолжаться в течение шести циклов лечения или до начала прогрессирования заболевания, как описано, например, в Таблице 30. VXQ-350 поставляли в виде лиофилизированного порошка в стеклянных флаконах. Перед введением твердый лекарственный продукт восстанавливают во флаконах, добавляя во флакон 4 мл стерильной воды для инъекций USP, получая концентрацию восстановленного лекарственного средства SapC во флаконе 2,2 мг/мл. Затем восстановленный лекарственный продукт разбавляют до целевой концентрации для внутривенного введения в стерильном 0,9% физиологическом растворе в мешках для внутривенного введения. Каждую дозу вводят путем внутривенной инфузии в течение примерно 45 ± 15 минут.
15
20
25

Таблица 30: График введения

График введения VXQ-350			
Цикл 1 - неделя 1	Цикл 1 - Неделя 2	Цикл 1 - Недели 3 & 4	Циклы 2-6
Дни 1-5 (5 последовательных дней)	Дни 8, 10, & 12 (через день)	Дни 15 & 22 (Один раз в 7 +3 дня)	Дни 29, 57, 85, 113, & 141 (Один раз в 28 +3 дня)

Фиг. 26 представляет собой таблицу, показывающую демографические характеристики и нежелательные явления по группам дозирования на фазы 1a. О серьезных нежелательных явлениях, связанных с лечением, не сообщалось.

Доклинические значения РК/ТК аллометрически масштабировали для прогнозирования РК и воздействия (площадь под кривой (AUC)) при терапевтических дозах 0,7-2,4 мг/кг. Полученные в исследовании First In Human (FIH) значения по скорости выведения из организма человека, конечного объема распределения (V_z), периода полувыведения и AUC (при дозах 0,7-2,4 мг/кг) были следующими: клиренс (Cl) 57-76 мл/кг/час, V_z 314-509 мл/кг, период полувыведения 3,5-5 часов. Соответствующие значения AUC варьировали в диапазоне от 10020 до 42330 ч*нг/мл. Эффективность обычно наблюдали на мышинных моделях при дозах 4-16 мг/кг и соответствующих AUC 7400-29600 ч*нг/мл. На основе данных, полученных на мышах, значения, полученные в исследовании FIH попадают в желаемый диапазон. На фиг. 27A-C представлены три набора графиков, иллюстрирующих фармакокинетические результаты в день 1 (фиг. 27A), день 4 (фиг. 27B) и день 22 (фиг. 27C) фазы 1 исследования. Данные представлены в виде графика в полулогарифмическом масштабе (вверху каждого набора). Фармакокинетика имела дозозависимый характер.
35
40
45

На фиг. 29 представлен график пловца, иллюстрирующий результаты пациента,

полученные на Фазе 1а испытаний. Ниже в примерах 12-14 обсуждаются случаи некоторых отдельных субъектов.

Пример 12. Применение фармацевтической композиции, содержащей SapC и DOPS, для лечения пациента с диагнозом париектальная анапластическая эпендимома.

5 Методы

Эпендимомы являются редкими первичными опухолями нервной системы, на которые приходится около 3% опухолей головного мозга среди взрослого населения в США. Стандарт лечения включает максимальную хирургическую резекцию и лучевую терапию. Какая-либо лекарственная терапия, одобренная FDA, отсутствует.

10 В октябре 2014 года у 67-летнего белого мужчины с раком простаты была диагностирована анапластическая эпендимома в левой теменной области. Ему была сделана полная резекция с последующим адьювантным облучением. Повторная МРТ головного мозга в апреле 2017 г. показала локальный рецидив. Он получил 3 цикла лечения темлозомидом, на которые у пациента отсутствовал ответ. В сентябре 2017
15 года пациент участвовал в исследовании VXQ-350; на момент включения в исследование его общее состояние по шкале Восточной совместной онкологической группы (ECOG) был равен 1, и основными симптомами были афазия и правосторонняя слабость. Пациент получил цикл 1 (в/в вливание 2,4 мг/кг VXQ-350 в дни 1-5, 8, 10, 12, 15, 22) и 3 дополнительных цикла (1×28 дней). Пациент находился под наблюдением до
20 смертельного исхода на предмет безопасности, ответа, уточненной оценки в нейроонкологии (RANO) и статуса эффективности ECOG.

Результаты

Изначально височное поражение составляло 6,4 × 3,2 см, связанное с инвазией в череп и кожу головы. Через 2 цикла было зафиксировано незначительное уменьшение
25 размера внутричерепных усиливающих компонентов (общее стабильное заболевание по RANO). Пациент получил 4 полных цикла VXQ-350 без побочных эффектов и токсичности. Цикл 5 был отменен из-за увеличения объема на МРТ. Он умер через 6 месяцев после включения в исследование из-за опухоли головного мозга. Посмертная гистология и макроанатомия показали обширный некроз опухоли головного мозга с
30 хондронидной дифференцировкой и признаки некротической болезни в грудном и поясничном отделах позвоночника при микроскопии. Некроз опухоли головного мозга, наблюдаемый при вскрытии, оказался связанным с лечением и свидетельствовал о токсичности препарата для опухолевых клеток.

На фиг. 28A-D представлены результаты гистологического анализа и
35 макроанатомического анализа, выполненные после смерти; слева направо: (A) Исходный хирургический образец показал небольшое количество признаков эпендимальной дифференцировки и обильные митотические фигуры. H&E при 40-кратном увеличении; (B) Общий анализ мозга при вскрытии показал обширный некроз опухоли; (C) Микроскопическое исследование срезов опухоли показало наличие небольшой
40 жизнеспособной опухоли (H&E при 4-кратном увеличении со вставкой при 40-кратном увеличении); (D) При вскрытии была обнаружена обширная дифференцировка хондронидов в том месте, где опухоль распространилась через хирургический дефект и в кожу головы.

Пример 13 Применение фармацевтической композиции, содержащей SapC и DOPS, для лечения пациентов с диагнозом глиома высокой степени злокачественности

Девять взрослых пациентов с глиомой высокой степени злокачественности (HGG) были включены в исследование по эскалации дозы, предназначенное для изучения безопасности VXQ-350. Дозы, вводимые циклами в соответствии с протоколом,

представленным в таблице 30, находились в диапазоне от 0,7 мг/кг до 2,4 мг/кг. Восемь из девяти пациентов с HGG завершили полный набор циклов до отмены (семь из-за прогрессирования; один - добровольный отказ).

У одного пациента с GBM, завершившего более шести циклов (> 12 месяцев) лечения дозами, начиная с 0,7 мг/кг, наблюдали стабильное заболевание, уменьшение размера поражения и отсутствие значительного прогрессирующего функционального неврологического дефицита. У шестерых из пациентов с HGG показатели RANO/RECIST улучшились на 113 день.

Пример 14. Применение фармацевтической композиции, содержащей SapC и DOPS, для лечения пациента с диагнозом аденокарцинома аппендикса

62-летняя женщина с местнораспространенной муцинозной аденокарциномой аппендикса проходила курс лечения в рамках исследования фазы 1a. После резекции и послеоперационной адъювантной химиотерапии (FOLFOX) рецидив в тазу с вовлечением яичников в 2007 г. привел к операции по удалению опухоли, включая тотальную абдоминальную гистерэктомию/двустороннюю сальпингооферэктомию с последующей системной терапией иринотеканом и цетуксимабом. В 2009 г. рецидив привел к обширной хирургической операции по удалению основной массы опухоли и гипертермической перфузии брюшной полости с полной ремиссией. После отказа от лечения рецидива в 2016 году она начала лечение VXQ-350 в июле 2017 года. Женщина получала 2,4 мг/кг VXQ-350 внутривенно в соответствии с протоколом фазы 1, и у нее наблюдался частичный ответ. Женщина продолжила лечение на фазе 1b исследования после завершения 11 циклов без серьезных побочных эффектов, связанных с VXQ-350.

Пример 15. Применение фармацевтической композиции, содержащей SapC и DOPS, для лечения пациентов с диагнозом аденокарцинома прямой кишки

Взрослые пациенты с различными солидными опухолями были включены в исследование по эскалации дозы, предназначенное для изучения безопасности VXQ-350. Дозы, вводимые циклами в соответствии с протоколом, приведенным в таблице 30, находились в диапазоне от 0,7 мг/кг до 2,4 мг/кг. До отмены лечения все пациенты завершили как минимум один цикл.

Один пациент с диагнозом метастатической (Stage IV) аденокарциномы прямой кишки завершил продолжавшееся более 12 месяцев лечение дозами, начиная с 1,8 мг/кг, и спустя более чем 12 месяцев лечения у него наблюдали стабильное заболевание с доказательствами значительного снижения метаболической активности опухоли согласно данным позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием фтордезоксиглюкозы (F-18 FDG). См. Фиг. 30A и 30B.

СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Vexion Pharmaceuticals Inc.
 <120> Фармацевтические композиции сапозина С и способы лечения рака
 <130> 47144-0002W01
 <150> US 62/678,668
 <151> 2018-05-31
 <150> US 62/647,058
 <151> 2018-03-23
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 80
 <212> Белок

11. Фармацевтическая композиция по п. 1, в которой полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и находится в концентрации от 1,9 до 2,5 мг/мл;

5 липид фосфатидилсерина представляет собой DOPS и находится в концентрации от 2,0 до 2,8 мг/мл;

буфер представляет собой Трис и находится в концентрации от 23 до 27 мМ;

трегалоза находится в концентрации от 4 до 6% (мас./об.);

рН композиции находится в диапазоне рН от 6,8 до 7,6; и

10 композиция дополнительно содержит трет-бутиловый спирт в количестве менее чем 0,5 мас.%.
12. Композиция в твердой форме для получения композиции по п. 1, содержащая:

полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, содержащую от нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций;

липид фосфатидилсерина;

15 буфер; и

трегалозу в количестве от 75 до 90 мас.%,

где трет-бутиловый спирт отсутствует или присутствует в количестве менее чем 3 мас.%, и

20 причем полипептид находится в концентрации от 3,2 до 4,4 мас.%, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1.

13. Композиция по п. 12, в которой буфер представляет собой Трис в концентрации от 5,6 до 7,6 мас.%.
14. Композиция по п. 12, в которой буфер представляет собой цитратный буфер в

25 концентрации от 9 до 13 мас.%.
15. Композиция по п. 12, в которой буфер представляет собой ацетатный буфер в

концентрации от 3 до 5 мас.%.
16. Композиция по п. 12, в которой липид фосфатидилсерина представляет собой

DOPS.
17. Композиция по п. 12, в которой липид фосфатидилсерина содержит один или

30 более из DOPS, липида дигексаноил фосфатидилсерина, липида диоктаноил фосфатидилсерина, липида дидеканоил фосфатидилсерина, липида дилауроил фосфатидилсерина, липида димиристоил фосфатидилсерина, липида дипальмитоил фосфатидилсерина, липида пальмитоил-олеоил фосфатидилсерина, липида 1-стеароил-
35 2-олеоил фосфатидилсерина или липида дифитаноил фосфатидилсерина.

18. Композиция по п. 12, в которой аминокислотная последовательность полипептида содержит SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными вставками, заменами или делециями.

19. Композиция по п. 12, в которой аминокислотная последовательность полипептида
40 содержит SEQ ID NO: 1.

20. Композиция по п. 12, в которой аминокислотная последовательность полипептида состоит из SEQ ID NO: 1.

21. Композиция по п. 12, дополнительно содержащая трет-бутиловый спирт в количестве менее чем 3 мас.%.
22. Композиция по п. 12, в которой

45 полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и находится в концентрации от 3,3 до 4,3 мас.%;
липид фосфатидилсерина представляет собой DOPS и находится в концентрации от

3,4 до 4,8 мас.%;

буфер представляет собой Трис и находится в концентрации от 6,0 до 7,2 мас.%;

трегалоза находится в концентрации от 81 до 87,3 мас.%; и

5 композиция дополнительно содержит трет-бутиловый спирт в концентрации менее чем 3 мас.%.
23. Композиция для получения композиции в твердой форме по п. 12, содержащая:

полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

содержащую от нуля до четырех аминокислотных вставок, замен или делеций;
липид фосфатидилсерина;

10 буфер с рН от 5,0 до 8,0 в концентрации от 10 до 50 мМ;

трегалозу в количестве от 1,5 до 9 мас.%;

трет-бутиловый спирт от 15 до 25 мас.%; и

воду,

15 причем концентрация полипептида составляет от 0,4 до 5,0 мг/мл, и молярное отношение липида фосфатидилсерина к полипептиду находится в диапазоне от 8:1 до 20:1.

24. Композиция по п. 23, в которой буфер представляет собой трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), и рН композиции находится в диапазоне от 6,8 до 7,6.

25. Композиция по п. 23, в которой буфер представляет собой цитратный буфер.

20 26. Композиция по п. 23, в которой буфер представляет собой ацетатный буфер.

27. Композиция по п. 23, в которой липид фосфатидилсерина представляет собой диолеилфосфатидилсерин (DOPS).

28. Композиция по п. 23, в которой липид фосфатидилсерина содержит один или более из DOPS, липида дигексаноил фосфатидилсерина, липида диоктаноил
25 фосфатидилсерина, липида дидеканоил фосфатидилсерина, липида дилауроил фосфатидилсерина, липида димиристоил фосфатидилсерина, липида дипальмитоил фосфатидилсерина, липида пальмитоил-олеил фосфатидилсерина, липида 1-стеароил-2-олеил фосфатидилсерина или липида дифитаноил фосфатидилсерина.

29. Композиция по п. 23, в которой аминокислотная последовательность полипептида
30 содержит SEQ ID NO: 1 с одной или двумя аминокислотными вставками, заменами или делециями.

30. Композиция по п. 23, в которой аминокислотная последовательность полипептида содержит SEQ ID NO: 1.

31. Композиция по п. 23, в которой аминокислотная последовательность полипептида
35 состоит из SEQ ID NO: 1.

32. Композиция по п. 23, в которой

полипептид содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и находится в концентрации от 1,9 до 2,5 мг/мл;

40 липид фосфатидилсерина представляет собой DOPS и находится в концентрации от 2,0 до 2,8 мг/мл;

буфер представляет собой Трис и находится в концентрации от 23 до 27 мМ;

трегалоза находится в концентрации от 4 до 6 мас.%; и

рН композиции находится в диапазоне рН от 6,8 до 7,6.

45 33. Способ лечения рака у пациента-человека, включающий введение пациенту композиции по п. 1.

34. Способ по п. 33, в котором пациент имеет солидную опухоль.

35. Способ по п. 33, в котором пациент имеет глиому или эпендиому.

36. Способ по п. 34, в котором пациент имеет рак желудочно-кишечного тракта.

37. Способ по п. 33, в котором композицию доставляют внутривенно в дозе в пределах от 0,4 до 7 мг/кг SapC, и отношение SapC к DOPS в композиции находится в диапазоне от 1:8 до 1:20.

38. Способ по п. 33, в котором композицию доставляют внутривенно в дозе от 2,3 до 2,5 мг/кг SapC, и отношение SapC к DOPS в композиции находится в диапазоне от 1:11 до 1:13.

39. Способ по п. 37, в котором композицию вводят пациенту несколько раз по меньшей мере в течение двух циклов следующим образом:

Цикл 1:

неделя 1: по одной дозе в каждый из дней 1-5;

неделя 2: три дозы через день;

недели 3 и 4: по одной дозе каждую неделю (каждые 7 (+/- 3) дней);

Цикл 2: одна доза в течение недели 5.

40. Способ по п. 39, дополнительно включающий по меньшей мере один последующий цикл, содержащий: одну дозу через 28 (+/- 3) дней после введения последней предыдущей дозы.

41. Способ лечения рака у пациента-человека, включающий восстановление композиции по п. 12 в воде или физиологическом растворе для получения восстановленной композиции и внутривенное введение пациенту дозы восстановленной композиции.

25

30

35

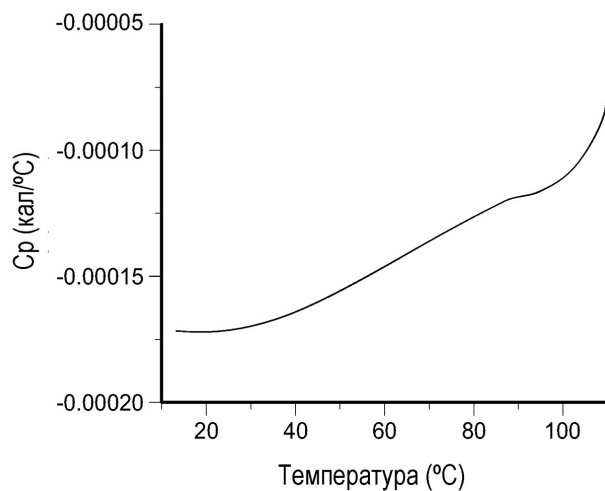
40

45

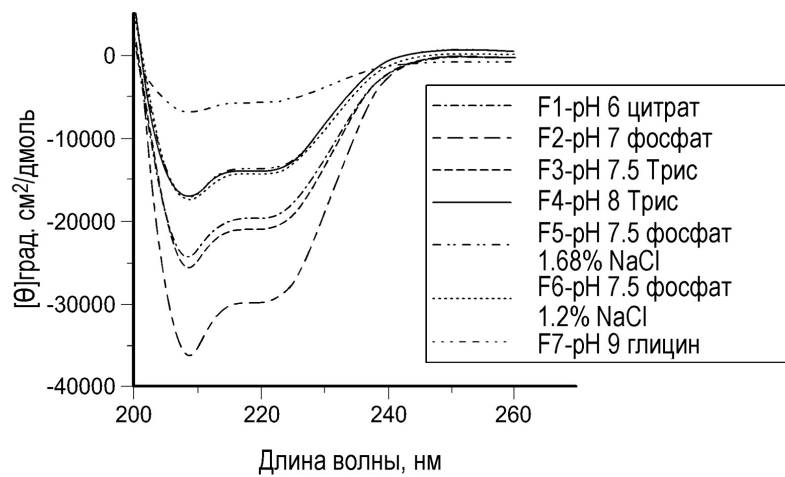
1

1/23

ФИГ.1



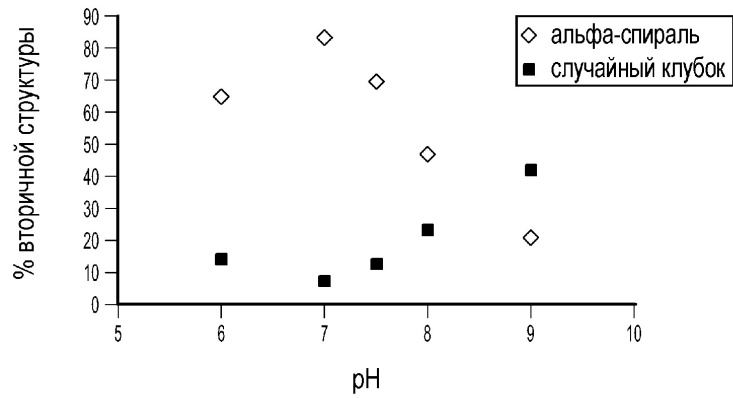
ФИГ.2



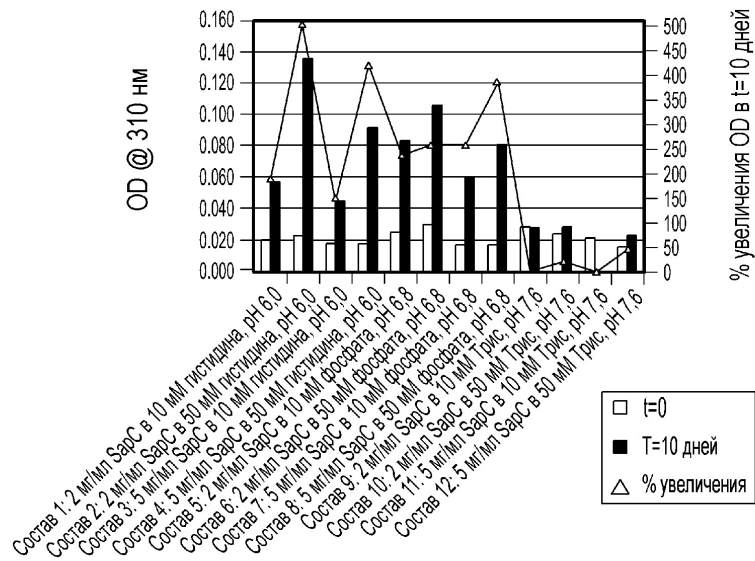
2

2/23

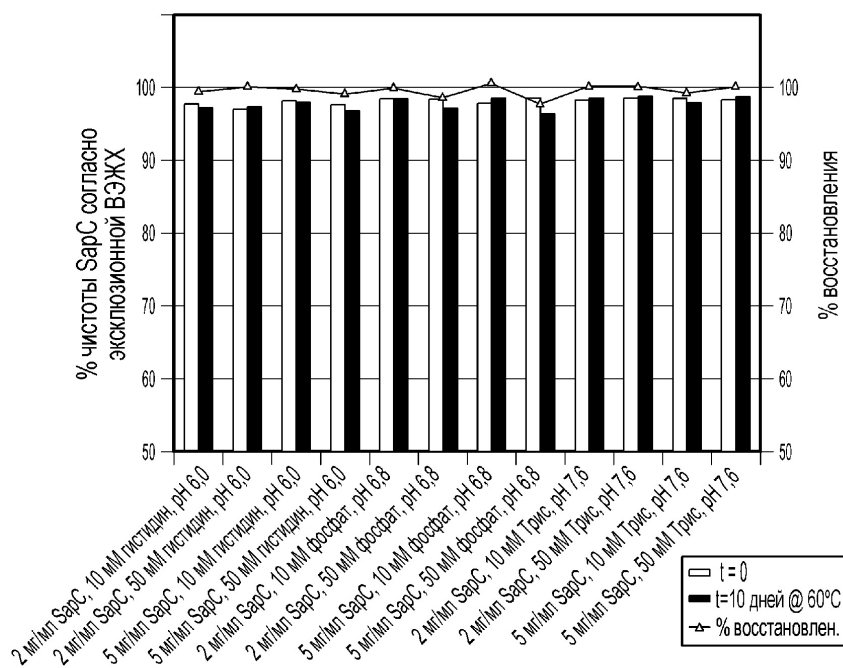
ФИГ.3



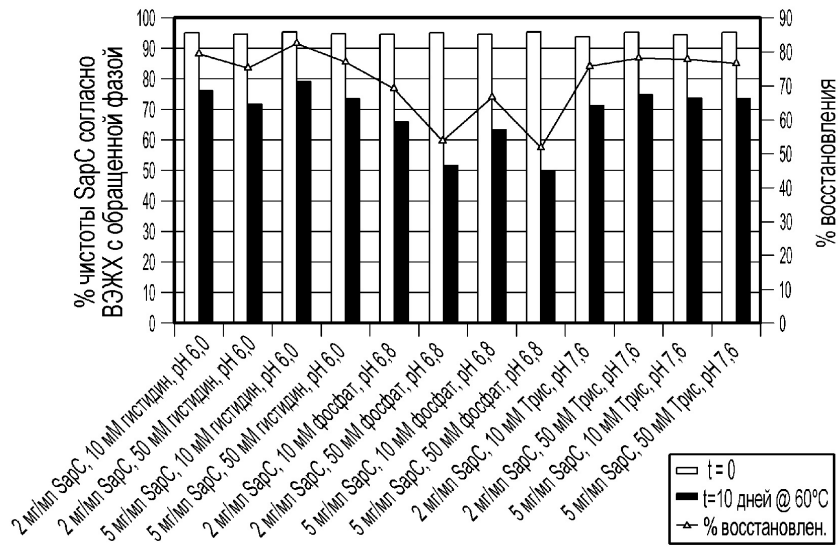
ФИГ.4



ФИГ.5

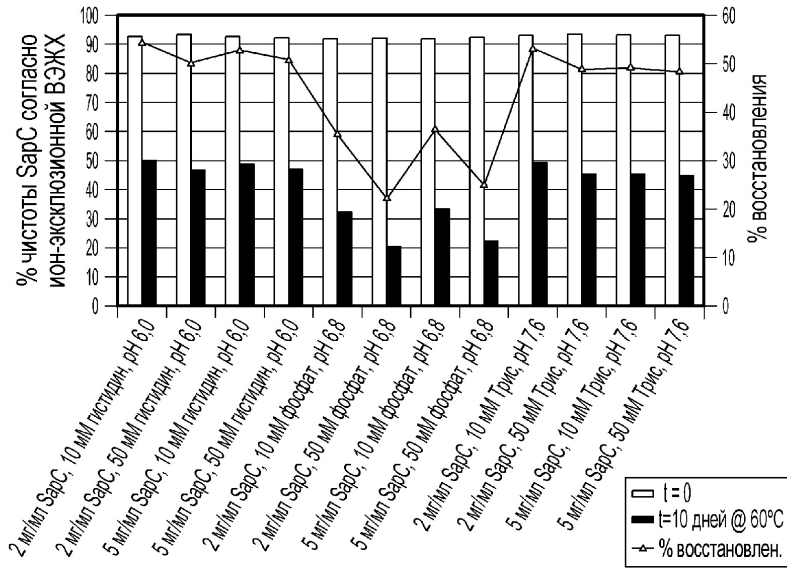


ФИГ.6

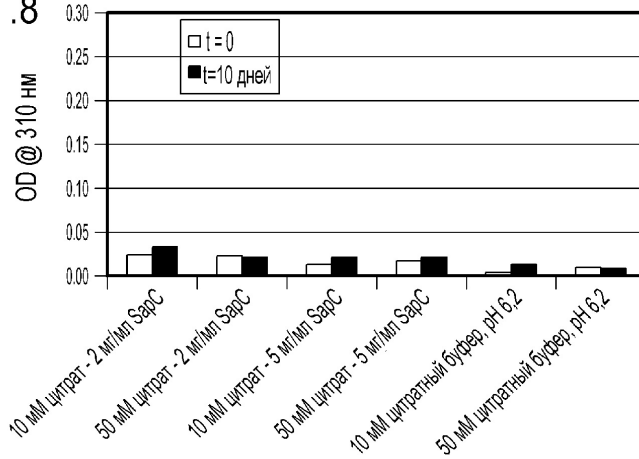


5/23

ФИГ.7

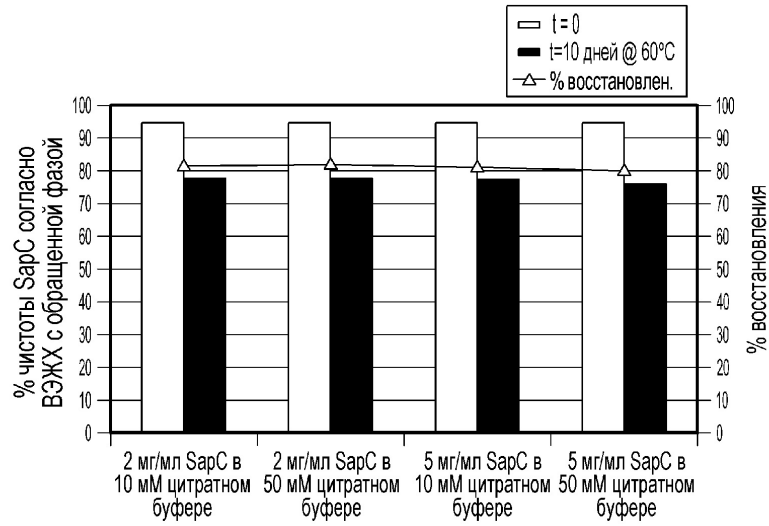


ФИГ.8

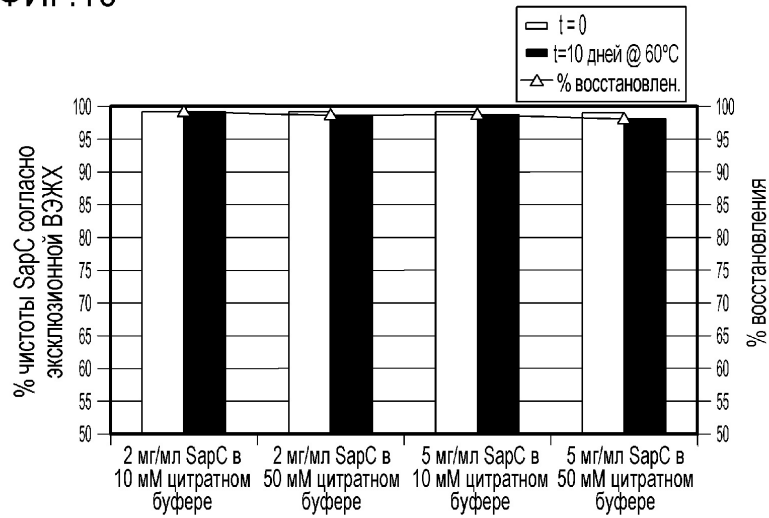


6/23

ФИГ.9

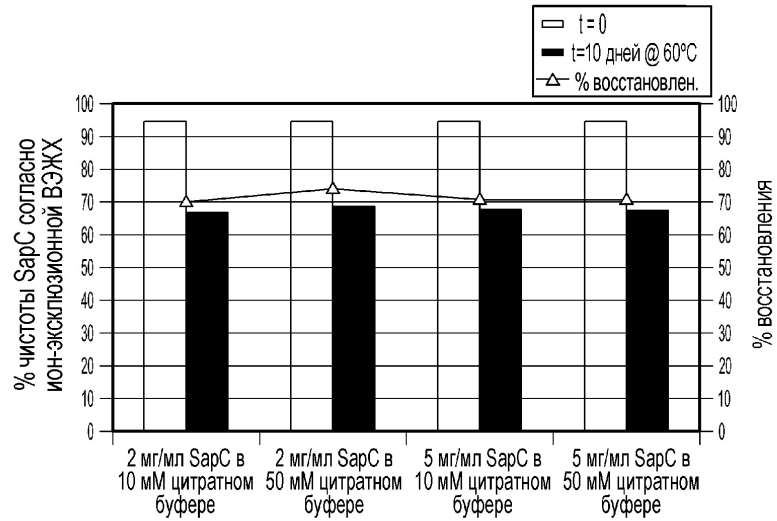


ФИГ.10

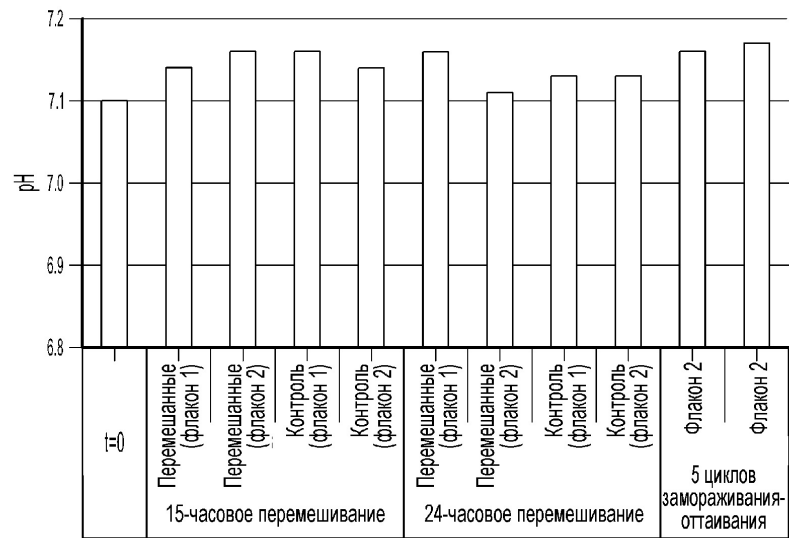


7/23

ФИГ.11



ФИГ.12

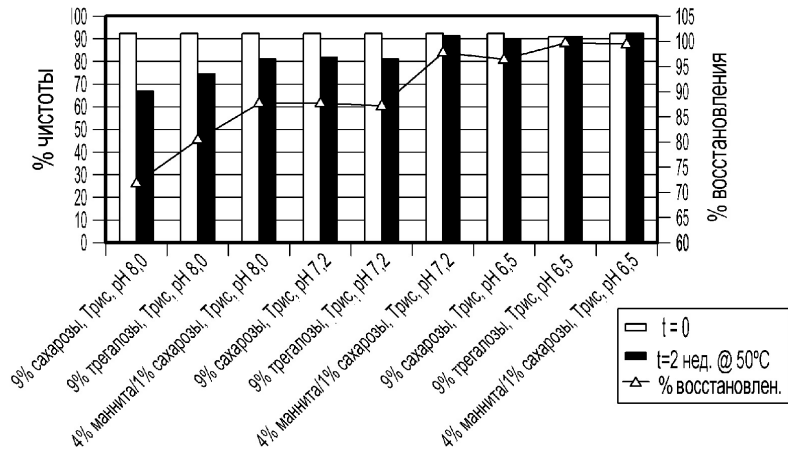


8/23

ФИГ.13

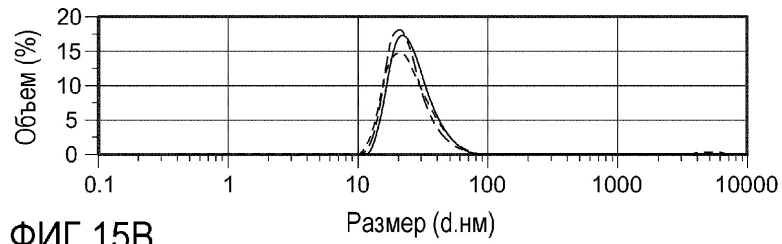


ФИГ.14

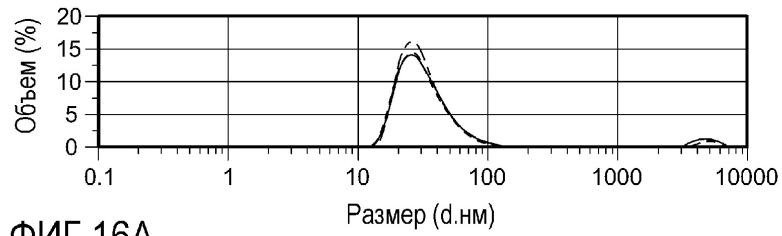


9/23

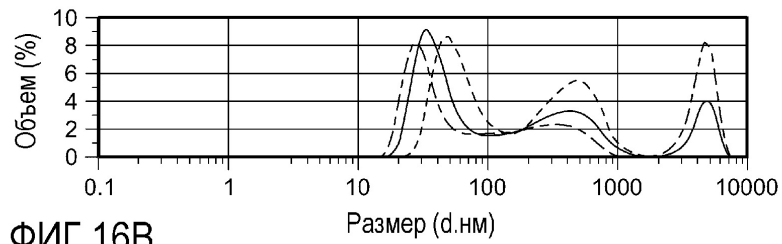
ФИГ.15А



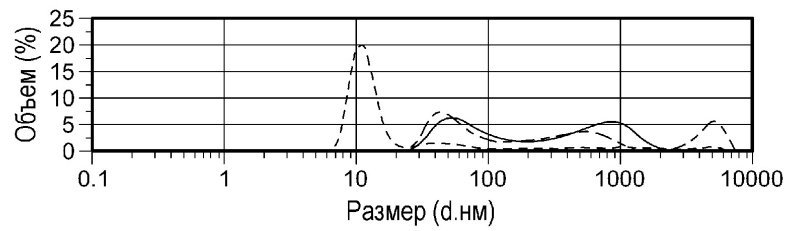
ФИГ.15В



ФИГ.16А

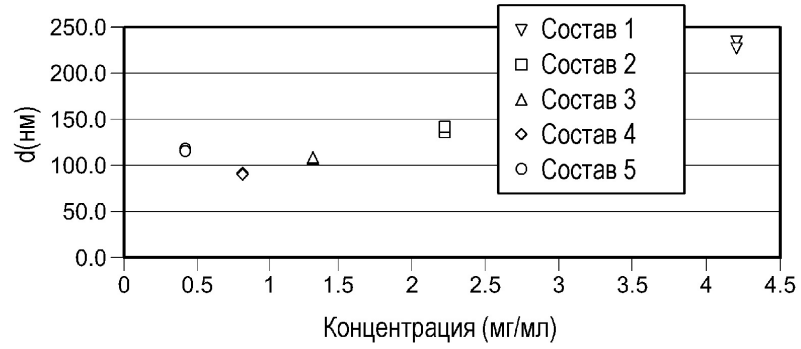


ФИГ.16В

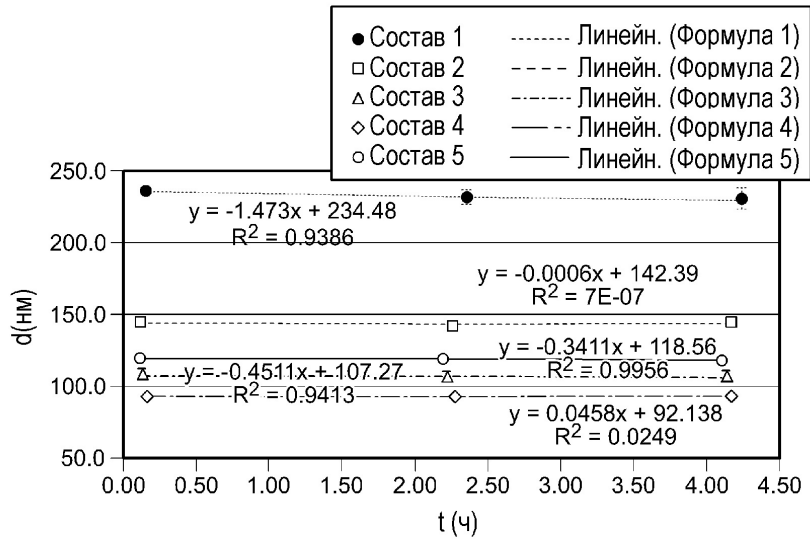


10/23

ФИГ.17

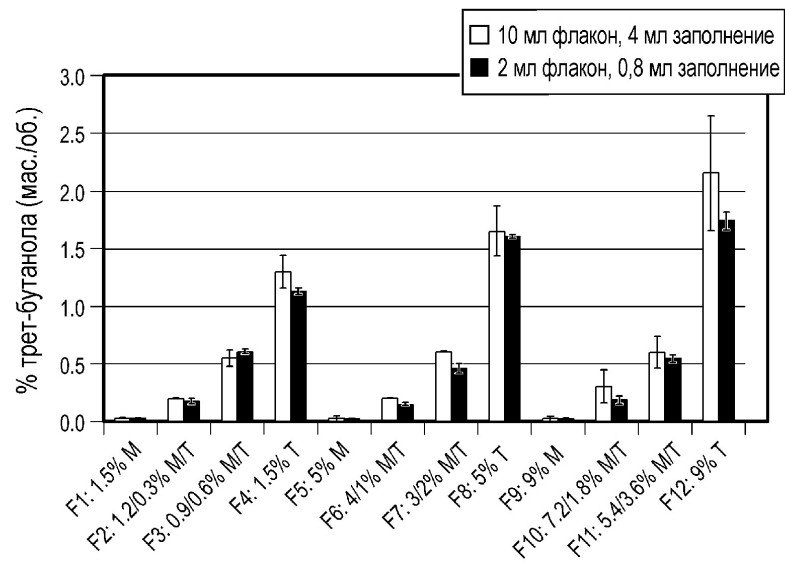


ФИГ.18

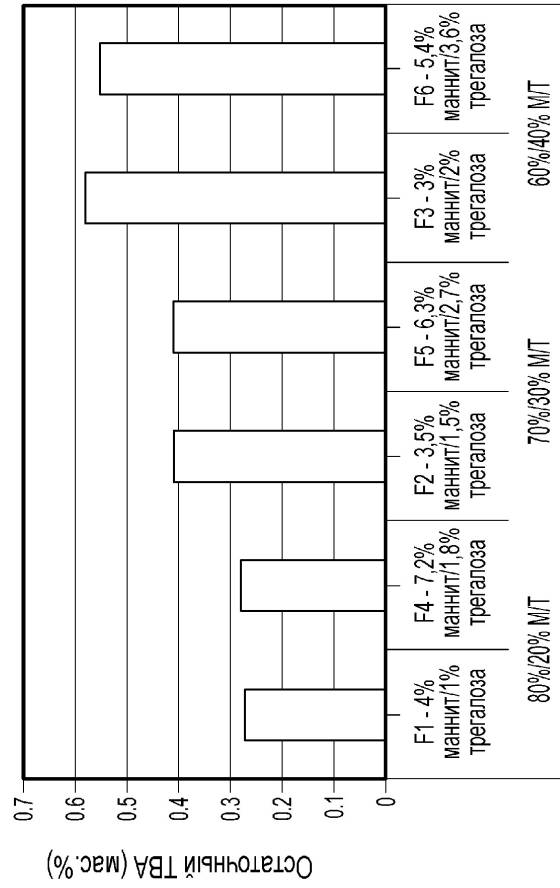


11/23

ФИГ.19

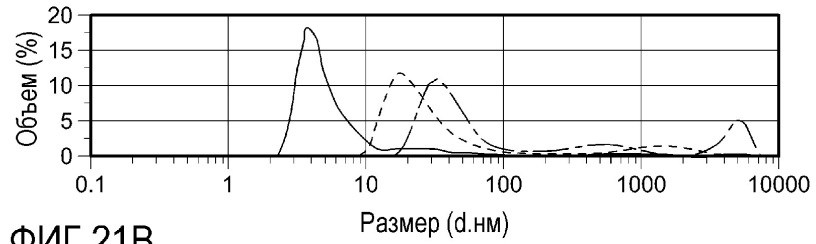


ФИГ.20

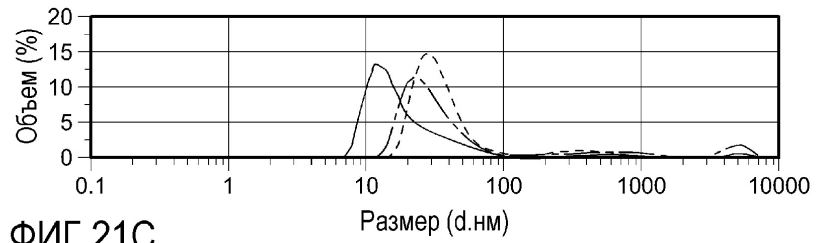


13/23

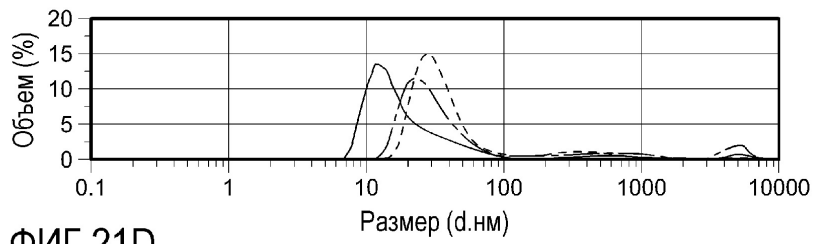
ФИГ.21А



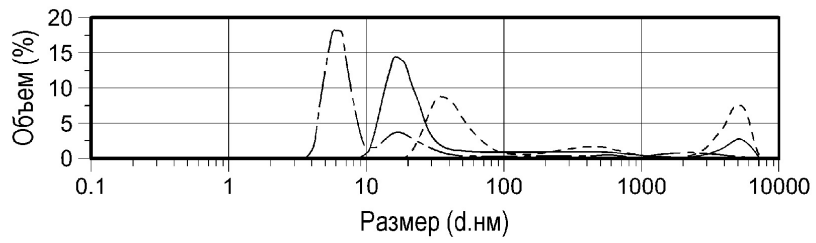
ФИГ.21В



ФИГ.21С

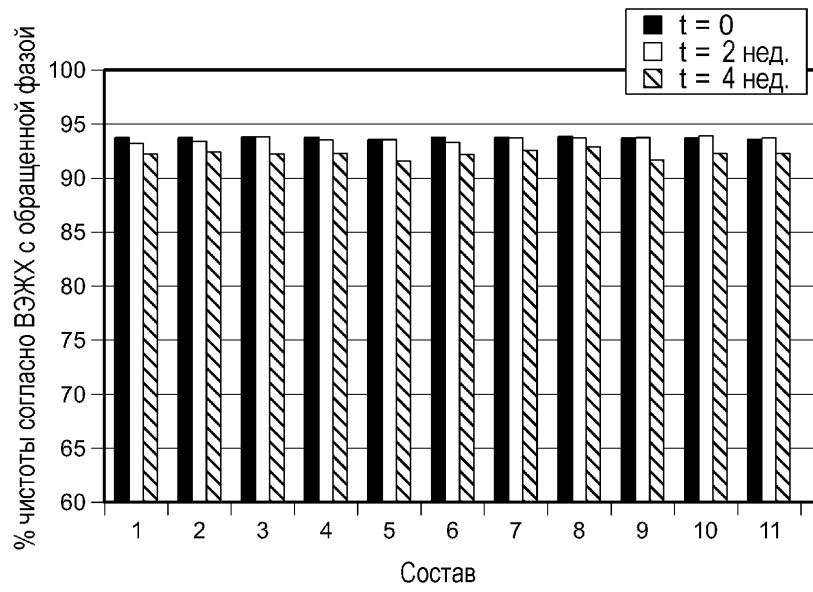


ФИГ.21D



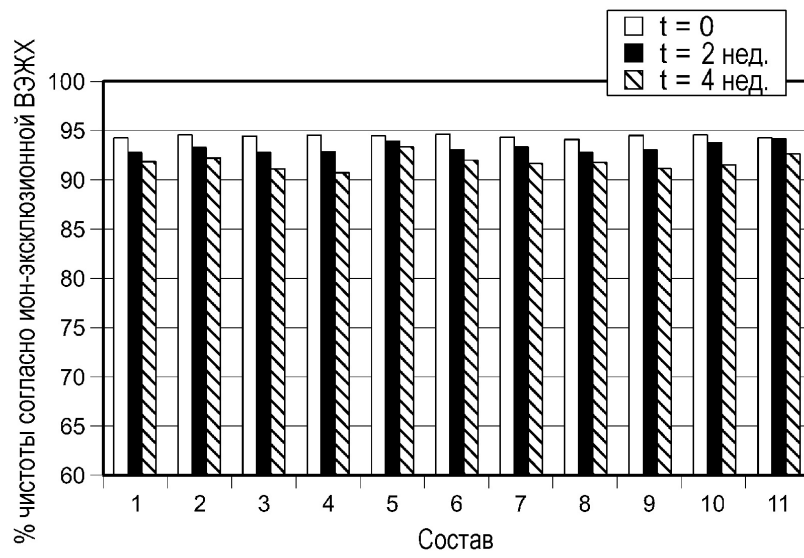
14/23

ФИГ.22



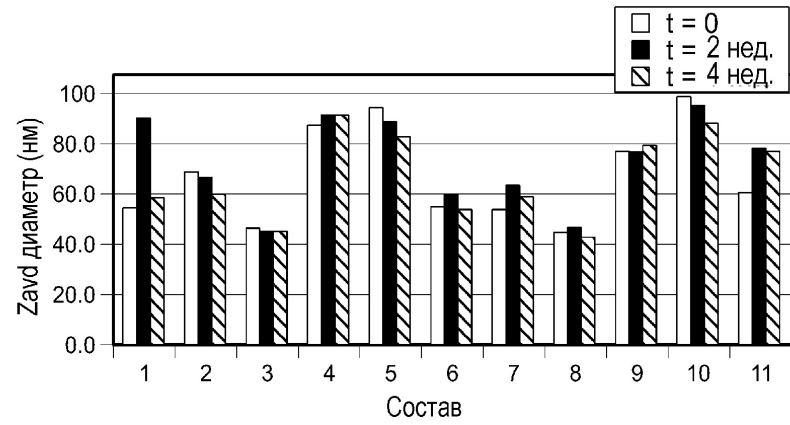
15/23

ФИГ.23

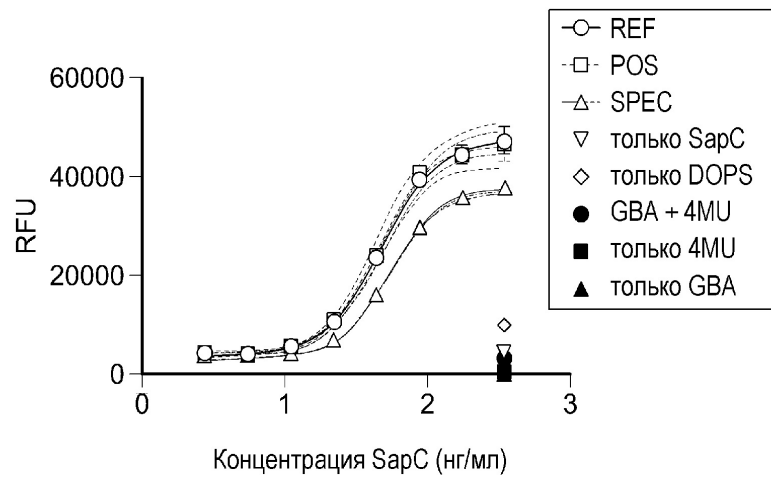


16/23

ФИГ.24



ФИГ.25



17/23

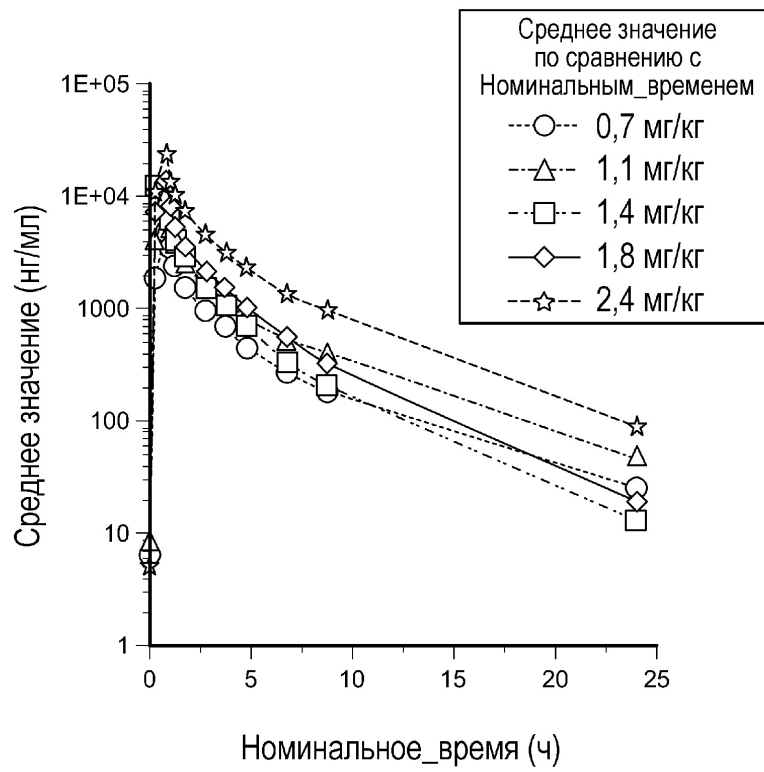
ФИГ.26

ДОЗА (мг/кг)	0.7	1.1	1.4	1.8	2.4
N	1	3	3	3	8
Средний возраст	64	53	58	49	54
Ж:М	0:1	0:3	2:1	1:2	2:2
Твердая опухоль	0	2	1	1	5
Улучшенная оценка RANO (n/NDY113)	1/1	1/1	1/2	-	-
Частичный ответ					
HGG	1	1	2	2	3
Улучшенная оценка RECIST (n/NDY113)	1/1				2/2
Несвязанное прерывание лечения		3	3	2	7
Нежелательные явления (n случаев, n событий)	1,15	3,54	3,37	3,32	8,80
Умеренной тяжести, связ. с лечением		3,6	1,1	1,2	2,2
Усталость		2,2		1,2	1,1
Нейропатия		1,1			
ЭКГ		1,2			
Баланс		1,1			
Нервная система		1,1			
Дизартрия		1,1			
Мочевыделительная система			1,1		
АД					1,1
Серьезные, не связанные с лечением	1,1	1,4	1,3	1,3	3,5
ЖКТ		1,1	1,1		1,3
Гипонатремия		1,1			
Слабость			1,1		

HGG: High Grade Glioma - HGG: глиома высокой степени злокачественности; RECIST: RECIST: критерии оценки ответа при солидных опухолях; RANO: Оценка ответа в нейроонкологии

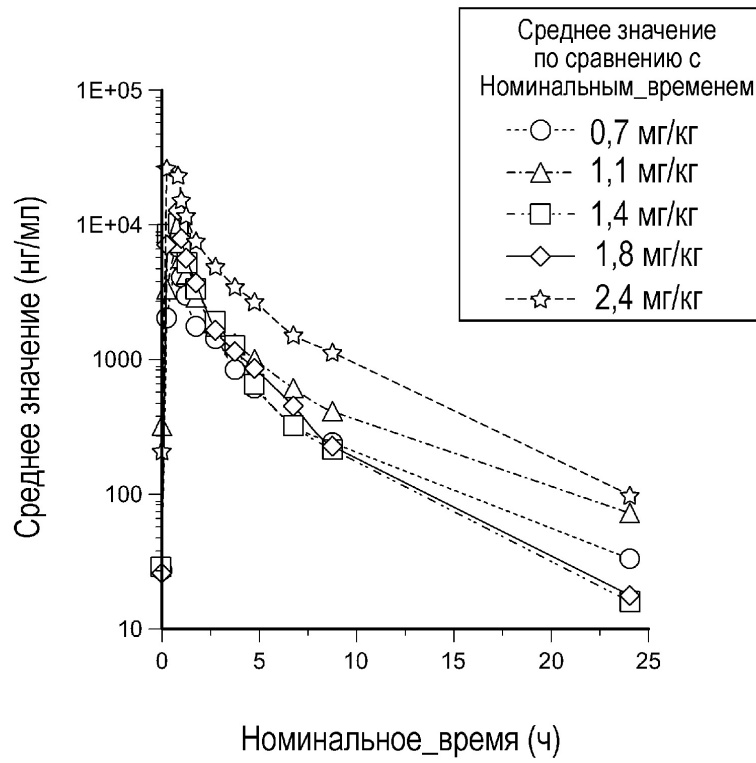
ФИГ.27А

День_Применения=1



ФИГ.27В

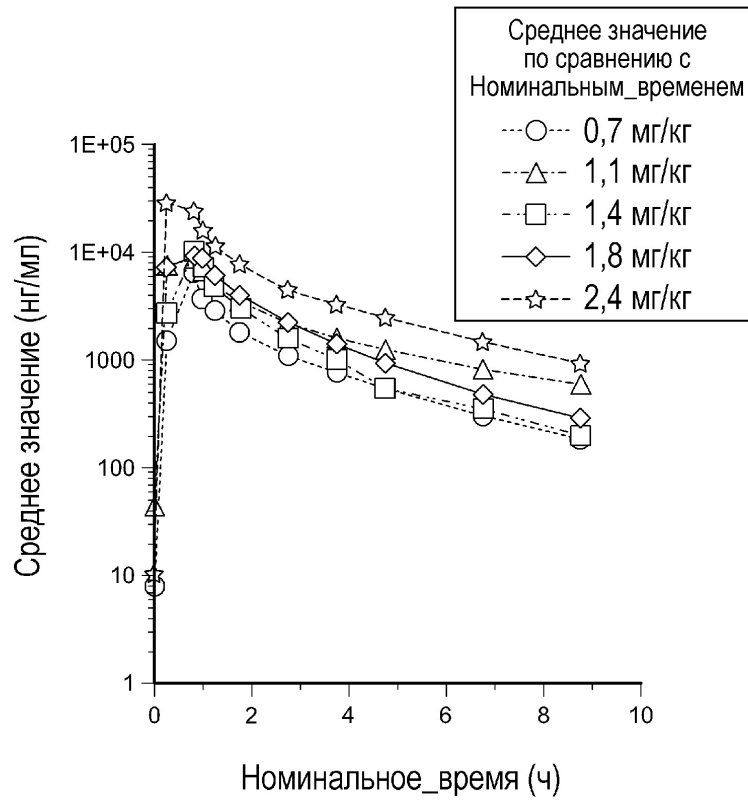
День_Применения=4



20/23

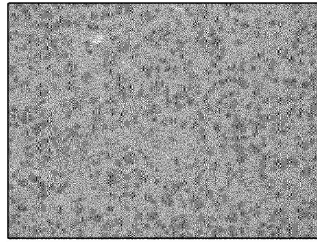
ФИГ.27С

День_Применения=22

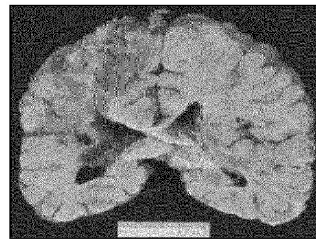


21/23

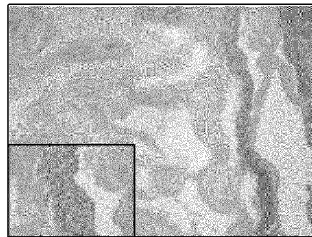
ФИГ.28А



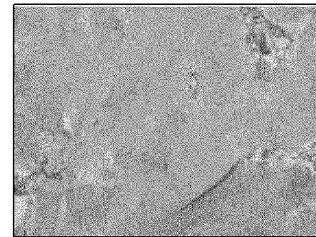
ФИГ.28В

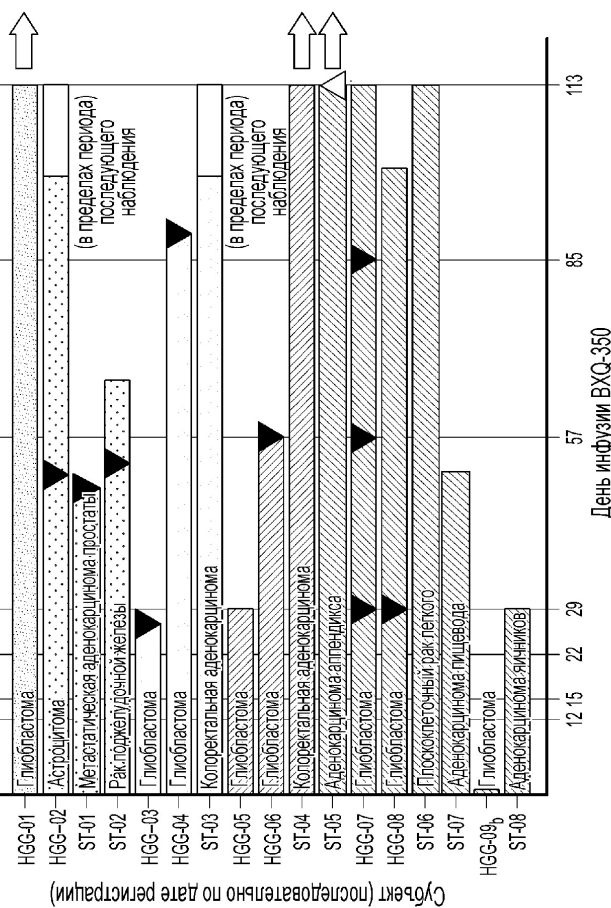


ФИГ.28С



ФИГ.28D



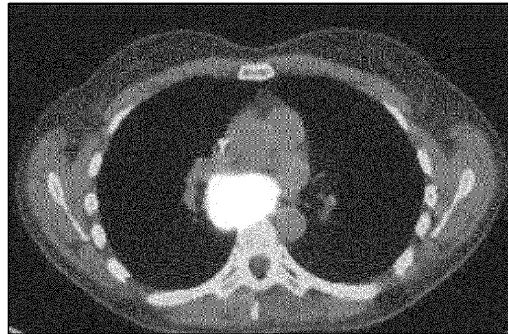


^a Стабильное заболевание согласно оценке RANO/RECIST; полученной в исследовании, сохраняться, если не отмечено красными/зелеными стрелками, другие клинические ухудшения или признаки/симптомы прогрессирования, не подтвержденные методами визуализации, использованными в исследовании, не показаны

^b Субъект HGG-09 был исключен по причинам, не связанным с исследованием, после получения первой дозы

23/23

ФИГ.30А



ФИГ.30В

