РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 587 056**(13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2013133953/15, 28.12.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2011

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
28.12.2010 EP 10197122.4

(43) Дата публикации заявки: **10.02.2015** Бюл. № **4**

(45) Опубликовано: **10.06.2016** Бюл. № **16**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO2006087205A1, 24.08.2006. EP2159230A1,03.03.2010. WO2004048517 A2, 10.06.2004.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **29.07.2013**

(86) Заявка PCT:
EP 2011/074181 (28.12.2011)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2012/089778 (05.07.2012)

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

(72) Автор(ы):
ДАНЕК-БУЛЛИУС Марина (AT),
ДОЙТЕЛЬ Бритта (AT),
ФЮРТИНГЕР Сабина (AT),
ПРАГЛЬ Берндт (AT),
КУЦМАН Драго (SI)

(73) Патентообладатель(и):
ХЕКСАЛЬ АГ (DE)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области фармакологии и медицины и касается стабильной фармацевтической композиции, содержащей антитело против TNF-альфа и адипиновую кислоту или адипат, а также применения указанной композиции для лечения, по меньшей мере, одного патологического состояния, выбранного из группы, включающей аутоиммунные заболевания, инфекционные болезни, неопластические заболевания, болезни нервной системы. Группа изобретений обеспечивает снижение агрегации антитела в водных растворах и повышение стабильности при хранении. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 13 табл., 4 ил.

RU 2587056 C2

RU 2587056 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 587 056**(13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2013133953/15, 28.12.2011**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2011

Priority:
(30) Convention priority:
28.12.2010 EP 10197122.4

(43) Application published: **10.02.2015** Bull. № **4**

(45) Date of publication: **10.06.2016** Bull. № **16**

(85) Commencement of national phase: **29.07.2013**

(86) PCT application:
EP 2011/074181 (28.12.2011)

(87) PCT publication:
WO 2012/089778 (05.07.2012)

Mail address:
129090, Moskva, B.Spasskaja, 25, str. 3, OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
DANEK-BULLIUS Marina (AT),
DOJTEL Britta (AT),
FYURTINGER Sabina (AT),
PRAGL Berndt (AT),
KUTSMAN Drago (SI)

(73) Proprietor(s):
KHEKSAL AG (DE)

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING BIOPHARMACEUTICAL DRUG

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: group of inventions refers to Pharmacology and medicine and concerns stable pharmaceutical composition containing antibody against TNF-alpha and adipic acid or adipate, as well as using said composition for treating at least, one of the pathological state, selected from group including autoimmune diseases, infectious diseases, neoplastic disease, diseases of nervous system.

EFFECT: group of inventions provides reduced aggregation antibodies in aqueous solutions and high stability during storage.

9 cl, 13 tbl, 4 dwg

RU 2587056 C2

RU 2587056 C2

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биофармацевтическое лекарственное средство.

Предпосылки создания изобретения

Биофармацевтические лекарственные средства, такие как белки, являются потенциальным сырьем для изготовления галенова препарата. Поскольку пероральный путь не доступен для большинства биофармацевтических лекарственных средств, композиция должна быть применима для парентерального применения, что предопределяет выбор водных композиций, а также по соображениям стабильности растворимых в воде порошков.

Такая композиция должна выполнять разнообразные задачи. Она должна обладать переносимостью после введения, в случае экстраваскулярного введения обеспечивать соответствующее всасывание биофармацевтического вещества в кровоток, если только место приложения действия не находится в месте введения, и создавать среду, которая гарантирует стабильность биофармацевтического лекарственного средства в терапевтически эффективной концентрации. Кроме того, композиция должна обеспечивать срок годности лекарственного средства по меньшей мере два года.

Обычно композиция биофармацевтического лекарственного средства содержит один или несколько буферов, изотонирующих веществ и воду для инъекций в качестве растворителя. Кроме того, часто добавляют стабилизаторы, такие как, например, криопротектор. Помимо этого, может добавляться один или несколько хелатообразующих агентов и поверхностно-активное вещество. Некоторые вещества могут выполнять двойную функцию, например, некоторые сахара или сахарные спирты могут служить криопротектором и изотонирующим веществом.

В следующей далее таблице приведен один из примеров водной композиции, которая используется для включения в ее состав человеческого моноклонального антитела.

Соединение	мг	Функция
Человеческое моноклональное антитело	40	Действующее соединение
Хлорид натрия	4,93	Изотонирующее вещество
Дигидрофосфат натрия × 2 H_2O	0,69	Буфер
Вторичный кислый фосфат натрия × 2 H_2O	1,22	Буфер
Трехзамещенный цитрат натрия	0,24	Буфер
Лимонная кислота	1,04	Буфер
Манит	9,6	Изотонирующее вещество
Полисорбат 80 ("Tween 80")	0,8	Поверхностно-активное вещество
Гидроокись натрия		Уравновешивание pH
Вода	До 0,8 мл	Растворитель

В следующей далее таблице приведен один из примеров лиофилизированной композиции, которая используется для включения в нее химерного моноклонального антитела.

Соединение	мг на пробирку	Функция
Химерное моноклонального антитела	100	Действующее соединение
Дигидрофосфат натрия × 1 H_2O	2,2	Буфер
Вторичный кислый фосфат натрия × 1 H_2O	6,1	Криопротектор
Сахароза	500	Изотонирующее вещество, криопротектор
Полисорбат 80 ("Tween 80")	0,5	Поверхностно-активное вещество

Композиции описанного рода отвечают приведенным выше требованиям переносимости после введения, стабильности биофармацевтического лекарственного средства и срока годности.

Тем не менее, указанные композиции имеют ряд недостатков. Одним из недостатков является то, что многие биофармацевтические лекарственные средства имеют тенденцию к агрегации, что неизбежно изменяет их физиологические свойства. В худшем случае такая агрегация приводит не только к снижению заданной эффективности лекарства, но также к повышению его иммуногенности, что может вызывать серьезные отрицательные последствия. Соответственно, предпочтительная композиция способствует уменьшению агрегации лекарственных средств.

Кроме того, ведутся споры по поводу переносимости некоторых из ингредиентов, используемых в существующих композициях. Это влечет необходимость замены таких ингредиентов.

Соответственно, в основу настоящего изобретения положена задача создания фармацевтических композиций биофармацевтических лекарственных средств, которые могут применяться в качестве альтернативы известных из уровня техники композиций.

Другой задачей настоящего изобретения является создание фармацевтических композиций биофармацевтических лекарственных средств, которые обладают преимуществами по сравнению с известными из уровня техники композициями.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание фармацевтических композиций биофармацевтических лекарственных средств, которые вызывают меньшую агрегацию лекарственных средств, чем известные из уровня техники композиции.

Решение этих задач обеспечивается за счет способов и средств согласно независимым пунктам формулы изобретения. В зависимых пунктах заявлены предпочтительные варианты осуществления. Подразумевается, что в диапазоны значений, ограниченные цифровыми величинами, включены эти предельные величины.

Краткое изложение сущности изобретения

Перед тем, как перейти к подробному описанию изобретения, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено конкретными компонентами описанных или стадия описанных способов, поскольку такие устройства и способы могут изменяться. Также подразумевается, что используемая терминология имеет целью лишь описание частных вариантов осуществления, а не ограничение изобретения. Следует отметить, что используемые в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа имеют значение единственного и/или множественного числа, если контекстом в прямой форме не диктуется иное. Кроме того, подразумевается, что при использовании диапазонов значений, ограниченных цифровыми величинами, в них включены эти предельные величины.

Согласно первой особенности настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая биофармацевтическое лекарственное средство и дополнительно содержащая по меньшей мере одну моно- или дикарбоновую кислоту с основной цепью из 2-6 атомов углерода или по меньшей мере одну ее соль. Моно- или дикарбоновая кислота с основной цепью из 2-6 атомов углерода или ее соль также именуется "буфером" в контексте настоящего изобретения.

В соответствии с известным уровнем техники фармацевтические композиции содержат биофармацевтическое лекарственное средство, неорганический буфер или его соль, такой как фосфатный буфер или трикарбоновую кислоту или ее соль, например, лимонную кислоту/цитрат. Она является трикарбоновой кислотой, которая, разумеется, эффективно выполняет функцию буфера. Тем не менее, авторами было обнаружено, что такой буфер может вызывать агрегацию лекарственных веществ.

В ходе исследований авторы неожиданно обнаружили, что композиция, содержащая лимонную кислоту (2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновую кислоту; $C_6H_8O_7$) или

цитрат, является менее предпочтительной с точки зрения образования агрегатов, чем композиции, содержащие моно- или дикарбоновую кислоту или ее соль (смотри раздел "Результаты"). Лимонная кислота является разветвленной трикарбоновой кислотой с основной цепью из 5 атомов углерода. Вне связи с какой-либо теорией причиной низкой эффективности лимонной кислоты, возможно, является потенциальное хелатирующее действие, которое три карбоксильные группы такой трикарбоновой кислоты оказывают на заряженные белки, такие как моноклональные антитела.

Подразумевается, что термин "из 2-6 атома углерода" относится ко всем соединениям, имеющим основную цепь 2, 3, 4, 5 или 6 атома углерода.

Используемый в описании термин "биофармацевтическое лекарственное средство" означает любое терапевтическое соединение, полученное из биологического или биотехнологического источника или синтезированное химическим путем и эквивалентное продукту, полученному из упомянутого источника, например, белок, пептид, вакцину, нуклеиновую кислоту, иммуноглобулин, полисахарид, клеточный препарат, растительный экстракт, животный экстракт, рекомбинантный белок или их сочетания. Обычно биофармацевтическое лекарственное средство является действующим ингредиентом биофармацевтического вещества.

Используемый в описании термин "стабилизатор" означает вещество, способствующее сохранению структурной целостности биофармацевтического лекарственного средства, в частности, при замораживании и/или лиофилизация и/или хранении. Такие вещества в контексте настоящего изобретения также именуются "криопротектором" или "лиопротектором".

Используемый в описании термин "моно- или дикарбоновая кислота с основной цепью из n атомов углерода" означает моно- или дикарбоновые кислоты, имеющие прямую алкильную или алкиленовую основную цепь из n атомов углерода. Разумеется, что основная цепь может иметь боковые цепи (например, метиловые группы); тем не менее, атомы углерода, содержащиеся в этих цепях, не учитываются при подсчете атомов углерода основной цепи. Согласно этому определению циклические сахарные кислоты, такие как, например, аскорбиновая кислота, не считаются "моно- или дикарбоновой кислотой с основной цепью из n атомов углерода", поскольку они не имеют прямой алкильной или алкиленовой основной цепи.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения композиция находится в форме, выбранной из группы, включающей

а) водную форму,

б) лиофилизированную форму и/или

в) суспензию.

Композиция в водной форме может являться готовой к введению, а композиция в лиофилизированной форме может быть преобразована в жидкую форму до введения, например, путем добавления воды для инъекций, которая необязательно может содержать консервант, такой как бензиловый спирт, ингибиторы окисления, такие как витамин А, витамин Е, витамин С, ретинил пальмитат и селен, аминокислоты цистеин и метионин, лимонную кислоту и цитрат натрия, синтетические консерванты, такие как эфиры параоксибензойной кислоты, например, метиловый эфир параоксибензойной кислоты и пропиловый эфир параоксибензойной кислоты.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления первой особенности настоящего изобретения композиция обеспечивает уменьшение агрегации биофармацевтического лекарственного средства в водном растворе по сравнению с известными из уровня техники композициями.

Используемый в описании термин "агрегация белка" означает образование белковых форм с более высокой молекулярной массой, таких как олигомеры или мультимеры, вместо желаемых заданных форм биофармацевтического лекарственного средства (например, мономера). Соответственно термин агрегация белка является универсальным и обозначает образование дополнительно не указанных мультимерных форм всевозможного рода, которые образуются посредством ковалентных связей или нековалентных взаимодействий.

С целью обнаружения агрегации белка может быть измерен коэффициент полидисперсности (PdI) и средний радиус белка (Z-Ave), например, описанным далее методом динамического рассеяния света (DLS). Агрегаты также могут измеряться описанным далее способом эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC или SEC). Агрегаты и частицы в целом также могут измеряться описанным далее методом визуализации микропотоков (MFI).

Моно- или дикарбоновые кислоты, подпадающие под приведенное определение, приведены в следующей далее таблице.

Таблица 1

Общепринятое название	Соль	Научное название	Общая формула
Адипиновая кислота	Адипат	Гександикислота	$C_6H_{10}O_4$
Яблочная кислота	Малат	Оксибутандикислота	$C_4H_6O_5$
Винная кислота	Тартрат	2,3-Диоксибутандикислота	$C_4H_6O_6$
Янтарная кислота	Сукцинат	Бутандикислота	$C_4H_6O_4$
Уксусная кислота	Ацетат	Этановая кислота	$C_2H_4O_2$
Глутаминовая кислота	Глутамат	2-аминопентандикислота	$C_5H_9NO_4$
Щавелево-уксусная кислота	Оксалоацетат	Охобутандикислота	$C_4H_4O_5$
Глутаровая кислота	Глутарат	Пентандикислота	$C_5H_8O_4$
α-Кетоглутаровая кислота	α-Кетоглутарат	2-Оксопентандикислота	$C_5H_6O_5$
Малеиновая кислота	Малеат	Цис-бутендикислота	$C_4H_4O_4$
Фумаровая кислота	Фумарат	Транс-бутендикислота	$C_4H_4O_4$

В одном из особо предпочтительных вариантов осуществления моно- или дикарбоновой кислотой или ее солью является дикарбоновая кислота с неразветвленной (т.е. без содержащих атомы углерода боковых цепей) основной цепью из 4, 5 или 6 атомов углерода или ее соль. В одном из особо предпочтительных вариантов осуществления моно- или дикарбоновой кислотой или ее солью является монокарбоновая кислота с неразветвленной основной цепью из 2 атома углерода или ее соль.

Моно- или дикарбоновой кислотой или ее солью особо предпочтительно является по меньшей мере одно из следующего, выбранного из группы, включающей:

уксусную кислоту или ацетат,

глутаминовую кислоту или глутамат,

адипиновую кислоту или адипат,

яблочную кислоту или малат,

винную кислоту или тартрат и/или

янтарную кислоту или сукцинат.

Особо предпочтительной карбоновой кислотой или солью из них является уксусная кислота или ацетат. Предпочтительно она используется в качестве единственной карбоновой кислоты или соли или даже в качестве единственного буфера в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Другой особо

предпочтительной карбоновой кислотой или солью является адипиновая кислота или адипат. Предпочтительно она используется в качестве единственной карбоновой кислоты или соли или даже в качестве единственного буфера в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Особо предпочтительно, чтобы моно- или дикарбоновая кислота присутствовала водной форме фармацевтической композиции в концентрации от ≥1 до ≤100 мМ, предпочтительно от ≥2 до ≤50 мМ, более предпочтительно от ≥5 до ≤25 мМ.

Кроме того, помимо моно- или дикарбоновой кислоты фармацевтическая композиция также может предпочтительно содержать фосфат натрия (далее - также "NaP") и/или лимонную кислоту или цитрат. Подразумевается, что термин "фосфат натрия" охватывает дигидрофосфат натрия, вторичный кислый фосфат натрия и все их возможные соли и/или гидраты.

Упомянутая водная форма фармацевтической композиции предпочтительно имеет pH от ≥3 до ≤9, предпочтительно от ≥4 до ≤8, более предпочтительно от ≥5 до ≤7.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления агрегация белка стимулируется взбалтыванием, напряжением сдвига, множеством циклов замораживания-оттаивания и/или длительным хранением и/или хранением при высоких температурах.

Используемый в описании термин "высокая температура" означает температуру хранения выше -18°C. Предпочтительно высокая температура, превышает температуру, выбранную из группы, включающей 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50°C или даже выше. Тем не менее, одним из ограничений температуры хранения является температура денатурации, которая находится в диапазоне 45-80°C в зависимости от природы соответствующего белка и условий среды.

Используемый в описании термин "длительное хранение" означает хранение фармацевтической композиции в течение более 1 месяца, предпочтительно более 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или даже 24 месяцев.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биофармацевтическим лекарственным средством является белок. Белком может являться природный белок, модифицированный белок (т.е. белок, который был модифицирован относительно его природного аналога, также именуемого шаблоном или матрицей) или полностью синтетический белок (т.е. белок, который не имеет природного аналога).

Белок может быть выделен из природного организма или может быть получен путем ферментации культивированного организма.

Кроме того, белком может являться белок, гомологичный или гетерологичный белку, выделенному из организма.

Особо предпочтительно, чтобы белок присутствовал в водной форме фармацевтической композиции в концентрации от ≥0,1 до ≤500 мг на мл$^{-1}$, предпочтительно от ≥20 до ≤200 мг на мл$^{-1}$.

Особо предпочтительно, чтобы белок являлся моноклональным антителом или его фрагментом или производным.

Используемый в описании термин "моноклональное антитело (mAb)" означает композицию антитела, содержащую гомогенную популяцию антитела, т.е. гомогенную популяцию, состоящую из цельного иммуноглобулина или его фрагмента или производного. Такое антитело особо предпочтительно выбирают из группы, включающей IgG, IgD, IgE, IgA и/или IgM или их фрагмент или производное.

Используемый в описании термин "фрагмент" означает фрагменты такого антитела,

сохраняющие в некоторых случаях способность связывать мишень, например, CDR (участок, определяющий комплементарность), гипервариабельный участок, вариабельную область (Fv), тяжелую цепь IgG (состоящую из VH, CH1, шарнира, участков CH2 и CH3), легкую цепь IgG (состоящую из участков VL и CL) и/или Fab и/или $F(ab)_2$.

Используемый в описании термин "производное" означает конструктивные элементы белка, отличающиеся по структуре от общего концептуального антитела, но при этом имеющие определенную конструктивную связь с ним, например, scFv, Fab и/или $F(ab)_2$, а также биспецифические, триспецифические или более высокоспецифические конструктивные элементы антител. Все они будут пояснены далее.

Другими производными антител, известными специалистам, являются димерные антитела, верблюжьи антитела, доменные антитела, двухвалентные гомодимеры с двумя цепями, состоящими из scFvs, IgAs (двух структур IgG, соединенных соединительным пептидом и секреторным компонентом), акульи антитела, антитела приматов Нового Света плюс CDR приматов не Нового Света, димеризованные конструктивные элементы, содержащие CH3+VL+VH и конъюгаты антител (например, антитело или фрагменты или производные, связывающие токсин, цитокин, радиоизотоп или метку).

Способы получения и/или выбора химерных, гуманизированных и/или человеческих моноклональных антител известны из техники. Например, в патенте US 6331415 на имя Genentech описано получение химерных антител, в патенте US 6548640 на имя Medical Research Council описаны методы пересадки CDR, а в патенте US 5859205 на имя Celltech описано получение гуманизированных антител. Библиотеки антител in vitro описаны, в частности, в патентах US 6300064 на имя MorphoSys и US 6248516 на имя MRC/Scripps/Stratagene. Методы фагового отображения описаны, например, в патенте US 5223409 на имя Dyax. Платформы трансгенных млекопитающих описаны, например, в патенте US 200302048621 на имя TaconicArtemis.

IgG, scFv, Fab и/или $F(ab)_2$ являются антителами хорошо известных специалистам форматов. Сопутствующие высокоэффективные технологии известны соответствующей справочной литературы.

Используемый в описании термин "Fab" означает фрагмент IgG, содержащий антигенсвязывающий участок и состоящий из одной постоянной области и одной вариабельной области каждой тяжелой и легкой цепи антитела.

Используемый в описании термин "$F(ab)_2$" означает фрагмент IgG, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных друг с другом дисульфидным мостиком.

Используемый в описании термин "scFv" означает вариабельный фрагмент с одиночной цепью, представляющий собой результат слияния вариабельных участков тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, связанных друг с другом коротким линкером, обычно серином (S) или глицином (G). Эта химерная молекула сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление постоянных участков и введения линкерного пептида.

Антителами модифицированных форматов являются, би- или триспецифические конструктивные элементы антител, слитые белки на основе антител, иммуноконъюгаты и т.п.

В одном из особо предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения белком является по меньшей мере одно антитело или его фрагмент или производное, выбранное из группы, включающей:

полученное из гибридомы антитело,
химеризованное антитело,
гуманизированное антитело и/или
человеческое антитело.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антителом или его фрагментом или производным является антитело против TNFα.

Один из примеров антитела к TNFα приведен в перечне последовательностей, прилагаемом к настоящей заявке. В нем SEQ ID 1 означает кодирующую последовательность нуклеиновых кислот тяжелой цепи IgG, SEQ ID 2 означает кодирующую последовательность нуклеиновых кислот легкой цепи IgG, а SEQ ID 3 и 4 означают аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно.

SEQ ID 5, 7 и 9 означают аминокислотные последовательности участков, определяющих комплементарность (CDR) легкой цепи (т.е. LC CDR 3, LC CDR 2 и LC CDR 1). SEQ ID 6, 8 и 10 означают аминокислотные последовательности участков, определяющих комплементарность тяжелой цепи (т.е. HC CDR 3, HC CDR 2 и HC CDR 1).

Следует отметить, что SEQ ID 1 и 2 или их части могут быть эквивалентно заменены последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими те же белки или белковые цепи, которые кодируют SEQ ID 1 и 2, но содержащими нуклеотидные замещения, приемлемые при дегенерации генетического кода, последовательностями, кодирующими часть, вариант, гомолог или производное белков или белковых цепей, кодированных SEQ ID 1 и 2, последовательностями нуклеиновых кислот, код которых оптимизирован для заданного экспрессирующего хозяина, и/или молекулой нуклеиновой кислоты, последовательность которой по меньшей мере на 70%, предпочтительно на 95% идентична SEQ ID 1 или 2.

Следует отметить, что SEQ ID 3-10 или их части могут быть эквивалентно заменены аминокислотными последовательностями, содержащими одно или несколько консервативных аминокислотных замещений, т.е. одно или несколько замещений, которые не влияют на существенные признаки белков, такие как сродство к связыванию мишени, иммуногенность, ADCC, время полувыведения из сыворотки и т.д.

Другими предпочтительными антителами являются антитела, которые распознают любой белок или сочетание белков, включающих без ограничения любые из перечисленных белков и/или следующие антигены: CD2, CD3, CD4, CDS, CD11a, CD14, CD18, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-1a, IL-1, IL-2, IL-3, IL-7, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, рецептор IL-2, рецептор IL-4, рецептор IL-6, рецептор IL-13, рецепторные субъединицы IL-18, PDGF-B и их аналоги, PLGF, VEGF, TGF, TGF-β2, TGF-p1, рецептор EGF, рецептор PLGF, рецептор VEGF, фактор роста гепатоцитов, остеопротегерин-лиганд, гамма-интерферон, стимулятор B-лимфоцита, комплемент C5, IgE, опухолеспецифический антиген CA125, опухолеспецифический антиген MUC1, антиген PEM, ErbB2/HER-2, опухолеассоциированные эпитопы, повышенные уровни которых присутствуют в сыворотке пациентов, онкоассоциированные эпитопы или белки, экспрессирующие в клетках рака молочной железы, толстой кишки, плоскоклеточного рака, рака простаты, поджелудочной железы, легкого и/или почек и/или в клетках меланомы, глиомы или нейробластомы, в центральной массе некротизированной опухоли, интегрин-альфа-4-бета-7, интегрин VLA-4, интегрины B2, рецепторы TRAIL 1, 2, 3 и 4, RANK, RANK-линанд, TNF-α, адгезивную молекулы VAP-1, молекулу адгезии эпителиальных клеток

(EpCAM), молекулу-3 межклеточной адгезии (ICAM-3), адгезин лейкоинтегрин, тромбоцитарный гликобелок gp IIb/IIIa, тяжелую цепь сердечного миозина, паратиреоидный гормон, MHC I, карциноэмбриональный антиген (CEA), альфа-фетопротеин (AFP), фактор некроза опухолей (TNF), рецептор Fc-y-1, HLA-DR 10-бета, антиген HLA-DR, L-селектин и IFN-γ.

Особо предпочтительно, чтобы антителом являлся IgG.

В качестве альтернативы, биофармацевтическим лекарственным средством является антитело-миметик, т.е. молекула связывающего мишень белка не на основе иммуноглобулина. Многие из упомянутых методов также применимы в отношении этих молекул. Такие антитела-миметики получают, например, из белков с анкириновым повтором, лектинов типа C, A-доменных белков Staphylococcus aureus, трансферринов, липокалинов, фибронектинов, домена Куница ингибиторов протеаз, убиквитина, цистеиновых узлов или ноттинсов, тиоредоксина A и т.д., и они известны специалистам в данной области техники из соответствующей литературы.

В качестве другой альтернативы, биофармацевтическим лекарственным средством является рекомбинантный слитый белок, содержащий любой из упомянутых выше белков или преимущественно сходных белков. Например, биофармацевтическим лекарственным средством, содержащимся в композиции согласно настоящему изобретению, могут являться рекомбинантные слитые белки, содержащие один из упомянутых выше белков плюс домен мультимеризации, такой как лейциновая "молния", двойная спираль, Fc-часть антитела, или преимущественно сходный белок. В частности, такие рекомбинантные слитые белки включают белки, в которых по меньшей мере TNFR- или RANK-часть слита с Fc-частью антитела. Рекомбинантные слитые белки особо предпочтительно содержат связывающий мишень домен и Fc-домен IgG (так называемые молекулы - цент).

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит по меньшей мере один стабилизатор, выбранный из группы, включающей аминокислоту, сахарный полиол, дисахарид и/или полисахарид.

Дисахаридом предпочтительно является вещество, выбранное из группы, включающей сахарозу, трегалозу, мальтозу и/или лактозу.

Сахарным полиолом также предпочтительно является вещество, выбранное из группы, включающей маннит и/или сорбит. Из них особо предпочтительным сахарным полиолом является маннит. Он предпочтительно используется в качестве единственного сахарного полиола или даже единственного стабилизатора в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Стабилизаторы, подпадающие под указанное определение, приведены в следующей таблице.

Таблица 2

Общеприня-тое название	Научное название	Общая формула
Аргинин	(S)-2-Амино-5-гуанидинпентановая кислота	$C_6H_{14}N_4O_2$
Глицин	Аминоуксусная кислота	$C_2H_5NO_2$
Маннит	(2R,3R,4R,5R)-Гексан-1,2,3,4,5,6-гексол	$C_6H_{14}O_6$
Сорбит	(2S,3R,4R,5R)-Гексан-1,2,3,4,5,6-гексол	$C_6H_{14}O_6$
Ксилит	(2R,3R,4S)-Пентан-1,2,3,4,5-пентол	$C_5H_{12}O_5$
Сахароза	β-D-Фруктофуранозил-(2→1)-α-D-глюкопиранозид	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Трегалоза	A-D-Глюкопиранозил α-D-глюкопиранозид	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Лактоза	4-O-β-D-Галактопиранозил-D-глюкоза	$C_{12}H_{22}O_{11}$

Мальтоза	4-O-α-D-Глюкопиранозил-D-глюкоза	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Декстран	Полисахарид	$H(C_6H_{10}O_5)_xOH$

Особо предпочтительно, чтобы стабилизатор присутствовал в водной форме фармацевтической композиции в концентрации от ≥1 мМ до ≤300 мМ, предпочтительно от ≥2 мМ до ≤200 мМ, более предпочтительно от ≥5 мМ до ≤150 мМ.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композицией является композиция, применимая для парентерального введения, предпочтительно внутривенного, внутримышечного и/или подкожного введения.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно вещество, выбранное из группы, включающей:

поверхностно-активное вещество,

изотонирующее вещество и/или

комплексен металлических ионов.

Поверхностно-активное вещество усиливает смачиваемость компонентов и способствует их растворимости. Это в особенности важно, поскольку биофармацевтические лекарственные средства часто содержатся в высоких концентрациях (например, >100 мг в 1-10 мл).

Применимыми поверхностно-активными веществами являются, например, лецитин и другие неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты ("Tween") или полоксамеры. Особо предпочтительными поверхностно-активными веществами являются полисорбат 80 ("Tween 80") и полоксамер 188.

Изотонирующее вещество служит для установления осмотического давления композиции согласно изобретению на физиологически приемлемом уровне, например, на уровне осмолярности крови.

Изотонирующее вещество является физиологически приемлемым компонентом и не ограничено конкретным веществом. Типичными примерами изотонирующего вещества являются, например неорганическая соль, такая как хлорид натрия, хлорид калия или хлорид кальция и т.п. Они могут применяться отдельно или в смеси.

Комплексен металлических ионов служит комплексообразованию тяжелых металлов, которые в противном случае могут инактивировать биофармацевтическое лекарственное средство, содержащееся в композиции согласно изобретению. Предпочтительно комплексоном металлических ионов является EDTA и/или EGTA.

Согласно второй особенности настоящего изобретения предложено биофармацевтическое лекарственное средство, входящее в состав композиции согласно первой особенности настоящего изобретения.

Согласно еще одной (третьей) особенности настоящего изобретения предложена первичная упаковка, такая как предварительно наполненный шприц или ланцет, пробирка или инфузионный мешок, содержащий композицию согласно первой особенности изобретения и/или биофармацевтическое лекарственное средство согласно второй особенности настоящего изобретения.

Предварительно наполненный шприц или ланцет может содержать композицию в лиофилизированной форме (которая затем должна быть сделана растворимой, например, с помощью воды для инъекций до введения) или в водной форме. Шприц или ланцет часто является изделием только для одноразового применения и может иметь объем от 0,1 до 20 мл. Тем не менее, шприц или ланцет также может представлять собой шприц или ланцет многоразового использования или дозирования.

Пробирка также может содержать композицию в лиофилизированной форме или в

водной форме и может служить устройством одноразового или многоразового использования. В качестве устройства многоразового использования пробирка может иметь больший объем.

Инфузионный мешок обычно содержит композицию в водной форме и может иметь объем от 20 до 5000 мл.

Согласно дополнительной (четвертой) особенности изобретения предложено применение фармацевтической композиции и/или биофармацевтического лекарственного средства и/или первичной упаковки согласно первой, второй и третьей особенностям, соответственно, настоящего изобретения для лечения по меньшей мере одного патологического состояния, выбранного из группы, включающей:

аутоиммунные болезни,

инфекционные болезни

новообразования и/или злокачественные опухоли (рак) и/или

болезни нервной системы.

Соответствующими аутоиммунными болезнями являются артрит и ревматизм, такой как псориаз, болезнь крона или ревматоидный артрит. Соответствующими инфекционными болезнями являются вирусные и/или бактериальные инфекции. Соответствующими новообразованиями и/или злокачественными опухолями являются саркомы, карциномы, лимфомы и лейкемии, предпочтительно, рак легкого, рак молочной железы, рак яичников, рак толстой кишки, рак простаты, рак шейки матки и т.п. Соответствующими болезнями нервной системы являются в том числе нейродегенеративные расстройства, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона или боковой амиотрофический склероз.

Описание чертежей и экспериментов

Дополнительные подробности, признаки, характеристики и преимущества объекта изобретения заявлены в зависимых пунктах формулы изобретения и раскрыты в следующем далее описании соответствующих чертежей и примеров, в которых в проиллюстрированы предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Тем не менее, эти чертежи никоим образом не подразумевают ограничение объема изобретения.

В описанных далее экспериментах композиции согласно настоящему изобретению подвергали воздействию особо стрессовых условий, способствующих агрегации. Соответственно, эксперименты имеют целью продемонстрировать эффективное предотвращение агрегации посредством композиции согласно настоящему изобретению.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 показана вызванная напряжением сдвига агрегация в "жестких" условиях, измеренная методом динамического рассеяния света (DLS) и выраженная в пересчете на средний радиус белка (Z-Ave; фиг.1а) и коэффициент полидисперсности (PdI; фиг.1б). Соответствующий средний показатель контрольной композиции, содержащей лимонную кислоту и NaP, обозначен горизонтальной линией. Уровень агрегации прямо пропорционален PdI и увеличению среднего радиуса белка (Z-Ave), что означает, что композиции с величиной Z-Ave и/или PdI ниже горизонтальной линии демонстрировали лучшие свойства агрегации (т.е. меньшую агрегацию), чем контрольная композиция. Данные, лежащие в основе диаграммы на фиг.1, представлены в Таблице 6.

На фиг.2 показана вызванная замораживанием-оттаиванием (FT) агрегация в "жестких" условиях, измеренная методом DLS и выраженная в пересчете на Z-Ave (фиг.2а) и PdI (фиг.2б). Соответствующий средний показатель контрольной композиции

обозначен горизонтальной линией. Уровень агрегации прямо пропорционален PdI и увеличению среднего радиуса белка (Z-Ave), что означает, что композиции с величиной Z-Ave и/или PdI ниже горизонтальной линии демонстрировали лучшие свойства агрегации (т.е. меньшую агрегацию), чем контрольная композиция. Данные, лежащие в основе диаграммы на фиг.2, представлены в Таблице 6.

На фиг.3 проиллюстрированы исследования стабильности, проведенные с использованием различных буферов в композиции, содержащей 105 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и 66 мМ маннита, при pH 5,2. Концентрация антитела составляла 50 мг/мл. Образцы хранили при различных температурах (5°C, 25°C и 40°C) и подвергли анализу методом эксклюзионной хроматографии с целью определения степени чистоты (фиг.3а) и уровней агрегации (AP = пики агрегации, фиг.3б). Данные, лежащие в основе диаграммы на фиг.3, представлены в Таблице 7.

На фиг.4 проиллюстрированы дальнейшие исследования стабильности, проведенные с целью обнаружения невидимых частиц методом визуализации микропотоков (MFI) в тех же условиях, что и на фиг.3. Представлены четыре различных испытания с частицами различных размеров (5-10 мкм (фиг.4а) в сравнении с >10 мкм (фиг.4б)). Данные, лежащие в основе диаграммы на фиг.4, представлены в Таблице 8.

Эксперименты

Перед тем, как перейти к подробному описанию экспериментов и их результатов, следует упомянуть, что эти эксперименты были проведены с использованием фармацевтических композиций, действующим ингредиентом которых являлось антитело против TNF-α (гуманизированный IgG с молекулярной массой около 150 килодальтон). С учетом структурного сходства антител, содержащих общий концептуальный IgG, специалист поймет, что полученные результаты могут быть непосредственно перенесены на фармацевтические композиции, содержащие мышиные, кроличьи, химерные, гуманизированные и/или человеческие антитела на основе IgG, и/или на антитела против других мишеней, например, против EGFR, против ErbB2, против CD 20, против VEGF и т.д. (смотри выше список потенциальных мишеней). Кроме того, специалист также поймет, что они также могут быть перенесены на описанные выше антитела-миметики, производные антител, модифицированные форматы антител или рекомбинантные слитые белки.

Помимо этого, хотя в прямой форме описаны некоторые сочетания буфера/стабилизатора, которые являются особо предпочтительными, специалист поймет, что на различных фигурах чертежей и в таблицах могут быть представлены конкретные сочетания буфера/стабилизатора, обладающие более высокой или такой же эффективностью, как и соответствующий контрольный буфер. Соответственно, хотя эти сочетания не описаны в прямой форме, они считаются однозначно раскрытыми и могут служить запасными вариантами при рассмотрении настоящей заявки или соответствующей выделенной или продолжающей заявки(-ок).

Материалы

Для исследования композиций в качестве типового антитела использовали моноклональное антитело против TNF-α. Антитело экспрессировали в клоне, выделенном из клеток линии SSF3 (производное CHO) и очистили на стадиях хроматографии по сродству к белку A, катионообменной хроматографии (CEX) и анионообменной хроматографии (AEX). Довели концентрацию антитела до около 50 мг/мл в приемлемом буфере и хранили в количествах, кратных 1 мл при температуре ниже -60°C.

Получение композиций для отборочных исследований

В рассмотренном исследовании были испытаны сочетания различных карбоновых кислот/солей и стабилизаторов (Таблицы 3а и 3б, соответственно). В некоторых случаях использовали смесь двух различных карбоновых кислот или смесь одной карбоновой кислоты и фосфата натрия (NaP).

Большинство композиций являлись композициями согласно изобретению, т.е. содержащими по меньшей мере одну моно- или дикарбоновую кислоту с основной цепью из 2-6 атомов углерода или по меньшей мере одну ее соль.

Некоторые композиции содержали лимонную кислоту и, соответственно, являлись композициями, известными из уровня техники. Эти композиции использовались в качестве контрольных и/или для сравнения.

Все испытанные композиции содержали 105 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и имели pH около 5,2. Готовые композиции получали из исходных растворов. Сначала получили 988 мкл композиции путем смешивания 870 мкл 23 мМ соли/кислоты (Таблица 3а), 22 мкл 5М NaCl, 81 мкл 817 мМ стабилизатора (Таблица 3б) и 15 мкл 50 мМ Tween 80 в качестве поверхностно-активного вещества. За одну серию испытаний получили 42 композиции (7 солей/кислот × 6 стабилизаторов) на планшете с глубокими лунками. Затем перенесли 470 мкл смеси композиции на планшет с глубокими лунками для разбавления белка, добавили в четные колонки 30 мкл антитела до концентрации около 50 мг/мл и смешали. Соответственно, целевая концентрация белка составляла 3 мг/мл.

В нечетных колонках получил композиции плацебо (без белка) путем добавления 30 мкл чистой воды. Наконец, перенесли 100 мкл каждой полученной композиции на четыре проницаемых для ультрафиолетового излучения планшета Half Area Greiner (микротитрационных планшета). Сразу после переноса на микротитрационные планшеты определили концентрацию белка и рассеяние вследствие агрегации путем измерения соотношения A280 и A340/A280 в спектрофотометре Tecan Infinite 200. Запечатали микротитрационные планшеты и подвергли соответствующим испытаниям в стрессовых условиях. Каждая композиция на микротитрационном планшете была получена в двух экземплярах.

Помимо исследования стабильности в условиях стрессовых условиях оценили влияние состава соответствующей композиции на термодинамическую стабильность антитела против TNF-α. С этой целью получили композиции, как описано выше, с концентрацией белка 1 мг/мл.

Таблица 3а

Список испытанных кислот/солей в экспериментах, проиллюстрированных на фиг.1 и 2 (Таблица 6).

№ буферной композиции	Соли/кислоты
1	20 мМ глутамата
2	20 мМ аконитовой кислоты
3	20 мМ аскорбиновой кислоты
4	20 мМ яблочной кислоты
5	20 мМ винной кислоты
6	20 мМ адипиновой кислоты
7	20 мМ лимонной кислоты
8	5 мМ глутамата + 20 мМ NaP
9	5 мМ яблочной кислоты + 20 мМ NaP
10	5 мМ винной кислоты + 20 мМ NaP
11	5 мМ адипиновой кислоты + 20 мМ NaP
12	20 мМ глутамата + 5 мМ лимонной кислоты
13	20 мМ яблочной кислоты + 5 мМ лимонной кислоты
14	20 мМ винной кислоты + 5 мМ лимонной кислоты
15	20 мМ адипиновой кислоты + 5 мМ лимонной кислоты

Все растворы содержали 105 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и имели pH около 5,2.

Таблица 3б

Список стабилизаторов, испытанных в сочетаниях с солями/кислотами из Таблицы 3а

№ Стабилизатора	Стабилизатор
1	Маннит
2	Глицин
3	Трегалоза
4	Сорбит
5	Сахароза
6	Нет*

* было получено несколько композиций стабилизаторов.

За одну серию было испытано 7 органических кислот/солей (B1-B7) и 5 стабилизаторов (Man = маннит, Gly = глицин, Thr = трегалоза, Sor = сорбит и Suc = сахароза). Композиции плацебо (без белка, помеченные буквой "B") поместили в нечетные колонки, а композиции, содержащие белок (помеченные буквой "P") поместили в четные колонки.

В качестве контрольной композиции использовали предлагаемую на рынке композицию, содержащую антитело против TNFα в растворе, содержащем 14,1 мМ фосфата натрия, 7,2 мМ цитрата, 105,5 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и 65,9 мМ маннита (CT = контроль). Конструкция планшета представлена в Таблице 4.

Таблица 4

Конструкция планшета для отборочных исследований 42 композиций

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	P1	B1+Man	P1+Man	B1+Gly	P1+Gly	B1+Thr	P1+Thr	B1+Sor	P1+Sor	B1+Suc	P1+Suc
B	B2	P2	B2+Man	P2+Man	B2+Gly	P2+Gly	B2+Thr	P2+Thr	B2+Sor	P2+Sor	B2+Suc	P2+Suc
C	B3	P3	B3+Man	P3+Man	B3+Gly	P3+Gly	B3+Thr	P3+Thr	B3+Sor	P3+Sor	B3+Suc	P3+Suc
D	B4	P4	B4+Man	P4+Man	B4+Gly	P4+Gly	B4+Thr	P4+Thr	B4+Sor	P4+Sor	B4+Suc	P4+Suc
E	B5	P5	B5+Man	P5+Man	B5+Gly	P5+Gly	B5+Thr	P5+Thr	B5+Sor	P5+Sor	B5+Suc	P5+Suc
F	B6	P6	B6+Man	P6+Man	B6+Gly	P6+Gly	B6+Thr	P6+Thr	B6+Sor	P6+Sor	B6+Suc	P6+Suc
G	B7	P7	B7+Man	P7+Man	B7+Gly	P7+Gly	B7+Thr	P7+Thr	B7+Sor	P7+Sor	B7+Suc	P7+Suc
H	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P
	B		B+M		B+Gly		B+Thr		B+Sor		B+Suc	

Методы

Стрессовые испытания

Осуществили отборочные испытания композиций путем двух стрессовых испытаний (замораживание/оттаивание и встряхивание, соответственно) в "мягких" и "жестких" условиях. "Мягкие" условия включали:

троекратное замораживание/оттаивание (замораживание при -20°C и оттаивание при комнатной температуре),

встряхивание со скоростью 400 об/мин при 40°C в течение 5 дней.

"Жесткие" условия включали:

десятикратное замораживание/оттаивание (замораживание при -20°C и оттаивание при комнатной температуре),

встряхивание со скоростью 600 об/мин при 40°C в течение 7 дней.

Мутность (опалесценция) - спектральная поглощательная способность на волне 340 нм

В основу измерений прозрачности или мутности (опалесценции) положен тот факт, что падающие лучи затухают вследствие рассеяния света. Присутствие равномерно взвешенных частиц, таких как агрегаты нерастворимого белка и осадок приводит к видимому увеличению ультрафиолетовой спектральной поглощательной способности

на волнах все длин вследствие эффекта рассеивания. Соответственно, мутность композиции измерялась с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов Tecan Infinite 200 как фотометрическая спектральная поглощательная способность на волне 340 нм, на которой ни один из известных хромофоров в композиции белка не демонстрирует собственное поглощение.

После 30 секунд встряхивания микротитрационного планшета измерили спектральную поглощательную способность на волнах 280 нм, 340 нм, 900 нм и 999 нм. В спектральную поглощательную способность A280 и A340 в каждой лунке была внесена поправка на длину пробега путем умножения в коэффициент (A999-A900)/0,147. Кроме того, в спектральную поглощательную способность растворов белка была внесена поправка на фон путем вычитания соответствующей спектральной поглощательной способности образца плацебо. Соответственно, концентрацию белка определяли в мг/мл как спектральную поглощательную способность A280 с поправкой на длину пробега и за вычетом поправки на фон, деленную на коэффициент 1,39 спектральной поглощательной способности антитела против TNF-α. Мутность выражали как соотношение величин A340 и A280 за вычетом поправки на фон.

Динамическое рассеяние света (DLS)

Анализ DLS осуществляли с использованием системы Malvern APS при температуре 25°C с помощью полупроводникового лазера, излучающего на волне 830 нм при угле рассеяния 90°. В основу этого метода положено измерение общей интенсивности рассеянного света, которая пропорциональна концентрации белка и размеру молекул рассеивающих свет частиц. Временной масштаб колебаний интенсивности рассеянного света анализировали путем автокорреляции с использованием программного обеспечения Malvern DLS. Перед каждым измерением мягко встряхивали микротитрационный планшет во избежание выпадения в осадок нерастворимых частиц. Согласно плану 20 мкл образца автоматически переносились в измерительную кювету и возвращались в лунку после измерения. Для каждого измерения регистрировалось колебание интенсивности рассеяния 13 раз за временной интервал 5 секунд, чтобы определить интенсивность функции автокорреляции. Путем применения модели многовершинного распределения определили такие параметры, как средний гидродинамический радиус белка Z-Average (нм), коэффициент полидисперсности PdI, гидродинамический радиус первых трех пиков, область интенсивности трех первых пиков и т.д. Не агрегированный белок описывается монодисперсным распределением по размерам. В результате агрегации белка образуется множество полидисперсных пиков распределения по размерам. Уровень агрегации традиционно оценивается по увеличению коэффициента полидисперсности (PdI) и увеличению среднего радиуса белка (Z-Ave).

Термодинамическая стабильность

Осуществили измерения методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) с использованием калориметра Auto Cap-DSC производства компании MicroCal, LLC (Нортгемптон, шт. Массачусетс, США). Для каждого измерения перенесли 400 мкл образца (композиции, содержащей белок) и контроля (композиции плацебо) на 96-луночный микротитрационный планшет. Прибор Auto Cap-DSC действовал с 15-минутным периодом уравновешивания до и между сканированиями в режиме 60°C/ч. Образцы сканировали при температуре от 30 до 95°C с быстрым охлаждением между сканированиями. В данные DSC вносили поправку на исходные показатели прибора и нормализовали к скорости сканирования и концентрации белка. Определяли избыточную теплоемкость (Cp) в ккал·K^{-1} на моль$^{-1}$, при этом 1000 калорий = 4,184 Дж.

Преобразование и анализ данных осуществляли с помощью программного обеспечения (OriginLab Corporation, Нортгемптон, шт. Массачусетс, США). Как принято в случае необратимых тепловых переходов моноклональных антител, стабильность оценивали по сдвигу температуры плавления первого пика.

Визуализация микропотоков

Визуализации микропотоков (MFI) является технологией визуализации, которая применяется для обнаружения и измерения невидимых и видимых частиц в растворе. При прохождении взвешенных в текучей среде частиц через чувствительную зону захватываются их цифровые изображения, которые автоматически анализируются с целью создания цифрового архива параметров частиц, таких как соотношение размеров и интенсивность. Кроме того, результаты определяются как размер и счет частиц.

До осуществления MFI систему промыли с использованием 0,9 мл образца буфера. После этого проанализировали 1 мл образца раствора с помощью системы MFI. Отбросили первые 0,2-0,3 мл. С целью определении концентрации частиц проанализировали по меньшей мере 25 изображений. После анализа 2000 частиц измерения прекратили. Дальнейший анализ данных осуществляли с использованием прикладного программного обеспечения MFI. Образцы могут анализироваться на предмет распределения по размерам или формы с целью получения дополнительной информации, например, о соотношении размеров.

Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматографии (SE-HPLC или SEC) применялась для разделения вариантов белка с меньшей и большей молекулярной массой, а также любых примесей и ингредиентов композиции. Результаты были определены как совокупность пиков агрегации (AP) и совокупность пиков распада (DP). В процессе SEC идентификацию образцов для испытания осуществляли путем сравнения времени удержания в хроматографе основных пиков и времени удержания основного пика исходного эталона.

SEC осуществляли с использованием одной колонки TSK-Gel G3000SWXL производства компании (5 мкм, 250 А, внутренний диаметр 7,8 мм, длина 300 мм) (Tosoh Bioscience, Штутгарт, Германия) и подвижной фазы, содержащей 150 мМ фосфата калия с pH 6,5. В колонке установили расход потока 0,4 мл/мин и температуре 30°C. Образцы разбавляли подвижной фазой до концентрации 0,75 мг/мл, а объем инъекций составлял 10 мкл.

Подтверждающие исследования

С целью подтверждения полученных результатов описанных выше отборочных исследований композиций был проведено исследование стабильности. Получили антитело, как описано выше, и дополнительно диализировали его в различных буферных системах. Полученные композиции содержали 105 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и 66 мМ маннита и имели pH на уровне 5,2. Концентрация антитела составляла 50 мг/мл. Образцы хранили при различных температурах (5°C, 25°C и 40°C) анализировали методом эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC) с целью определения степени чистоты и уровней агрегации, а также методом визуализации микропотоков (MFI) с целью обнаружения невидимых частиц. Метод SE-HPLC позволяет обнаруживать, в частности, димерные, гримерные, тетрамерные и пентамерные агрегаты соответствующего антитела (т.е. агрегаты с молекулярной массой до 800 килодальтон), а метод визуализации микропотоков (MFI) служит для обнаружения невидимых частиц в диапазоне размеров 5-30 мкм, т.е. примерно в 1000 раз более крупные агрегаты, чем обнаруживаемые методом SE-HPLC.

Результаты

С целью идентификации составов композиций, которые защищают антитело против TNF-α от агрегации на таком же уровне, как контрольная композиция, провели две серии отборочных исследований различных композиций (Таблица 3). В первой серии исследований композиции, содержащие антитело против TNF-α, подвергали двум стрессовым испытаниям в "мягких" условиях (троекратное замораживание/оттаивание и встряхивание со скоростью 400 об/мин при 40°C в течение 5 дней). После первого стрессового испытания определяли уровень агрегации в каждом образце путем измерения распределения по размерам методом DLS.

Помимо оценки потенциала защиты от агрегации измеряли влияние исследованных композиций на термодинамическую стабильность антитела против TNF-α, чтобы дополнительно продемонстрировать применимость композиций согласно изобретению для поддержания структурной целостности содержащегося в них биофармацевтического лекарственного средства. Сканировали термограммы DSC при 30-90°C. Температура плавления (Tm; температура первого пика) антитела против TNF-α в исследованных композициях согласно изобретению составляла от около 70°C до около 72°C, что сравнимо с его соответствующей температурой плавления в контрольной композиции (Tm=71,46±0,06°C (N=11)). Подробные данные Tm приведены в Таблице 5. Как показано в Таблице 5, композиции содержащие в качестве карбоновой соли/кислоты только трикарбоновые кислоты, такие как аконитовая кислота или лимонная кислота, и служащие контролем, обозначены курсивом и помечены звездочкой (*).

На основании данных DLS и DSC, полученных при испытании в "мягких" условиях, следующие композиции, содержащие адипиновую, адипиновую + лимонную, адипиновую + NaP, яблочную, яблочную + лимонную, винную или винную + лимонную кислоту/соль в сочетании со стабилизатором или без стабилизатора (глицина, маннита, сорбита, сахарозы или трегалозы), соответственно, были выбраны для дальнейшей оценки, на этот раз в "жестких" условиях.

Выбор был обусловлен сходством их PdI, Z-Ave и Tm с соответствующими показателями контрольной композиции (что прямо указывает на их приемлемость для медицинского применения). С целью обнаружения каких-либо характеристик испытанных композиций, превосходящих характеристики контрольной композиции, образцы дополнительно исследовали в "жестких" условиях (десятикратное замораживание оттаивание и встряхивание со скоростью 600 об/мин при 40°C в течение 7 дней). Эксперименты проводились дважды.

Методом DLS была обнаружена вызванная агрегация (Таблица 6, фиг.1 и 2). Измерения мутности не выявили какой-либо агрегации. Как ни удивительно, агрегация антитела против TNF-α была значительно более выраженной в контрольной композиции (фиг.1 и 2), чем в композициях согласно изобретению, например, содержащих моно- или дикарбоновую кислоту.

Агрегация, оценивавшаяся по Z-Ave (фиг.1а) и PdI (фиг.1б) после встряхивания со скоростью 600 об/мин в течение 7 дней при 40°C, показала, что все сочетания буфера/стабилизатора согласно изобретению (например адипиновая кислота + маннит) демонстрировали лучшие характеристики, т.е. меньший Z-Ave или PdI, чем контрольный буфер (лимонная кислота/NaP + маннит), за исключением некоторых сочетаний, содержащих винную кислоту (Z-Ave: винная кислота + маннит или сорбит; винная кислота/лимонная кислота + маннит или сорбит или трегалоза; PdI: винная кислота + маннит или сорбит; винная кислота/лимонная кислота + маннит или сорбит).

Следует отметить, что полученные стандартные отклонения, обозначенные планками погрешностей ("усами"), обычно довольно невелики, что говорит о статистической

значимости различия в характеристиках между контролем (значение Z-Ave или PdI которого обозначено горизонтальной планкой, т.е. 9,58 нм или 0,31) и соответствующим буфером. В отличие от этого, у содержащих винную кислоту сочетаний с худшими характеристиками, чем у контрольного буфера, наблюдались значительные стандартные отклонения, что указывает на то, что на соответствующие эксперименты могли повлиять конкретные паразитные эффекты.

Что касается экспериментов с замораживанием/оттаиванием, их результаты проиллюстрированы на фиг.2а и 2б. Эти эксперименты показывают, что в соответствующих условиях все испытанные композиции демонстрировали сходные характеристики (обозначенные большими планками погрешностей в эксперименте с PdI на фиг.2б), а некоторые заявленные композиции (например, адипиновая кислота + маннит, сорбит или сахароза) имели значительно лучшие характеристики, чем контрольная композиция.

В Таблицах 8 и 9 и на фиг.3 и 4 приведены результаты подтверждающих исследований, в которых в состав раствора, содержащего маннит (смотри выше), включали различные буферы. Исследования стабильности в течение 3 месяцев при 5,25 и 40°C (Таблица 7) методом эксклюзионной хроматографии (SE-HPLC) показали, что вследствие агрегации и распада действующего соединения (антитела против TNF-α) степень чистоты снизилась до уровня от около 98% (при хранении при 5°C) до 87% (при хранении при 40°C). В этом эксперименте все сравнивавшиеся буферы демонстрировали сходные характеристики. Смотри наглядное представление на фиг.3а. Исходная степень чистоты всех испытанных композиций составляла от 99,2 до 93% в начале экспериментов.

Тем не менее, также обнаруженная методом SE-HPLC сумма пиков агрегации (контрольного) фосфатного/цитратного значительно превышала (1,8% при хранении при 40°C) сумму большинства буферов согласно изобретению, например, 1,2% (янтарной кислоты) или 1,5% (уксусной кислоты). Смотри наглядное представление на фиг.3б.

Эксперименты методом визуализации микропотоков (MFI), в которых в образце заданного объема подсчитывались частицы в заданном диапазоне размеров, служили для обнаружения образования макроагрегаций в диапазоне 5-30 мкм через 3 месяца хранении при 40°C. Очевидно, что в диапазоне размеров 5-10 мкм все заявленные буферы имели лучшие характеристики, чем контрольный буфер (т.е. лимонная кислота + NaP). Смотри наглядное представление на фиг.4а. Особенно хорошие характеристики в этих условиях демонстрировали адипиновая кислота + маннит и уксусная кислота + маннит.

В диапазоне размеров >10 мкм число частиц всех буферов составляло менее 260 на мл$^{-1}$, что примерно в 30 раз меньше соответствующего предельного числа, установленного Европейской Фармакопеей (6.0), согласно которой предельное загрязнение инъекций и инфузий частицами не должно превышать 7500 частиц на мл$^{-1}$ для частиц размером >10 мкм. Смотри наглядное представление на фиг.4а. За счет хороших характеристик всех буферов счет частиц являлся очень небольшим, что статистически означает, что на результаты влияют значительные относительные стандартные отклонения вследствие небольшого счета частиц, и предполагает, что видимые различия в среднем счете частиц, например, между контролем и адипиновой кислотой не являются значимыми.

Таблица 5

Определенное методом DSC влияние состава солей/кислот и стабилизатора на температуру плавления

	Соли/кислоты	Стабилизатор	Tm (°C)			Соли/кислоты	Стабилизатор	Tm (°C)

1	Контроль (фосфат натрия + цитрат)	Манит	71,45		38	Глутаминовая NaP	Сахароза	72,01
2	Аконитовая*	Манит	70,47		39	Глутаминовая NaP	Трегалоза	71,9
3	Аконитовая*	Нет	70,04		40	Яблочная	Глицин	71,19
4	Адипиновая	Глицин	71,03		41	Яблочная	Маннит	70,79
5	Адипиновая	Манит	70,95		42	Яблочная	Нет	70,99
6	Адипиновая	Нет	70,8		43	Яблочная	Сорбит	71,19
7	Адипиновая	Сорбит	71,06		44	Яблочная	Сахароза	71,19
8	Адипиновая	Сахароза	71,1		45	Яблочная	Трегалоза	71,31
9	Адипиновая	Трегалоза	71,02		46	Яблочная Лимонная	Глицин	71,38
10	Адипиновая Лимонная	Глицин	71,21		47	Яблочная Лимонная	Маннит	71,28
11	Адипиновая Лимонная	Манит	70,96		48	Яблочная Лимонная	Сорбит	71,33
12	Адипиновая Лимонная	Сорбит	71,12		49	Яблочная Лимонная	Сахароза	71,4
13	Адипиновая Лимонная	Сахароза	71,24		50	Яблочная Лимонная	Трегалоза	71,4
14	Адипиновая Лимонная	Трегалоза	71,23		51	Яблочная NaP	Глицин	71,41
15	Адипиновая NaP	Глицин	71,47		52	Яблочная NaP	Маннит	71,66
16	Адипиновая NaP	Манит	71,56		53	Яблочная NaP	Сорбит	71,8
17	Адипиновая NaP	Сорбит	71,49		54	Яблочная NaP	Сахароза	71,98
18	Адипиновая NaP	Сахароза	71,58		55	Яблочная NaP	Трегалоза	71,73
19	Адипиновая NaP	Трегалоза	71,74		56	NaP	Маннит	71,28
20	Аскорбиновая	манит	70,94		57	NaP	Нет	70,89
21	Аскорбиновая	Нет	70,56		58	Винная	Глицин	71,4
22	Лимонная*	Маннит	70,53		59	Винная	Маннит	71,1
23	Лимонная*	Нет	70,49		60	Винная	Нет	70,94
24	Глутаминовая	Глицин	71,92		61	Винная	Сорбит	71,46
25	Глутаминовая	манит	71,51		62	Винная	Сахароза	71,29
26	Глутаминовая	Нет	70,89		63	Винная	Трегалоза	71,28
27	Глутаминовая	Сорбит	71,92		64	Винная Лимонная	Глицин	71,71
28	Глутаминовая	Сахароза	71,82		65	Винная Лимонная	Маннит	71,45
29	Глутаминовая	Трегалоза	71,91		66	Винная Лимонная	Сорбит	71,53
30	Глутаминовая Лимонная	Глицин	71,88		67	Винная Лимонная	Сахароза	71,74
31	Глутаминовая Лимонная	Манит	71,86		68	Винная Лимонная	Трегалоза	71,72
32	Глутаминовая Лимонная	Сорбит	71,88		69	Винная NaP	Глицин	71,6
33	Глутаминовая Лимонная	Сахароза	71,9		70	Винная NaP	Маннит	71,65
34	Глутаминовая Лимонная	Трегалоза	71,9		71	Винная NaP	Сорбит	71,77
35	Глутаминовая NaP	Глицин	71,82		72	Винная NaP	Сахароза	71,92
36	Глутаминовая NaP	Маннит	71,76		73	Винная NaP	Трегалоза	71,91
37	Глутаминовая NaP	Сорбит	71,71					

Таблица 6

Вызванная напряжением сдвига или замораживанием/оттаиванием агрегация в "жестких" условиях, измеренная методов DLS (PdI - коэффициент полидисперсности, Z-Ave - средний радиус, N=2 за исключением контрольной композиции, в которой N=12)

		Десятикратное замораживание/оттаивание				Встряхивание со скоростью 600 об/мин в течение 7 дней при 40°C			
		Z-Ave (нм)		PdI		Z-Ave (нм)		PdI	
Соли/кислоты	Стабилизатор	Средн.	Ст. откл.	Средн.	Ст. откл.	Средн.	Ст. откл.	Средн.	Ст. откл.
Контроль (фосфат натрия + цитрат)	Манит	7,26	0,96	0,27	0,04	9,58	3,87	0,31	0,15
Адипиновая	Глицин	7,13	0,25	0,29	0,02	6,00	0,17	0,18	0,01
Адипиновая	Манит	6,22	0,32	0,17	0,09	5,82	0,12	0,09	0,01
Адипиновая	Нет	6,74	0,40	0,31	0,06	5,85	0,17	0,10	0,04

Адипиновая	Сорбит	6,12	0,09	0,17	0,03	6,09	0,02	0,19	0,02
Адипиновая	Сахароза	5,98	0,17	0,14	0,03	6,06	0,23	0,16	0,04
Адипиновая	Трегалоза	6,37	0,22	0,23	0,01	7,61	2,33	0,17	0,00
Адипиновая + Лимонная	Глицин	6,37	0,02	0,27	0,03	6,03	0,01	0,21	0,02
Адипиновая + Лимонная	Манит	6,14	0,07	0,18	0,02	5,87	0,13	0,09	0,02
Адипиновая + Лимонная	Нет	6,69	0,59	0,30	0,08	5,88	0,09	0,10	0,04
Адипиновая + Лимонная	Сорбит	6,35	0,07	0,22	0,02	5,99	0,13	0,15	0,00
Адипиновая + Лимонная	Сахароза	6,27	0,08	0,22	0,02	6,23	0,02	0,21	0,01
Адипиновая + Лимонная	Трегалоза	6,67	0,25	0,26	0,05	6,51	0,06	0,25	0,00
Адипиновая + NaP	Глицин	6,44	0,06	0,30	0,01	5,95	0,11	0,18	0,01
Адипиновая + NaP	Манит	6,63	0,13	0,28	0,03	6,02	0,21	0,11	0,00
Адипиновая + NaP	Нет	6,07	0,01	0,21	0,00	6,01	0,48	0,13	0,11
Адипиновая + NaP	Сорбит	6,74	0,15	0,30	0,04	5,80	0,20	0,08	0,03
Адипиновая + NaP	Сахароза	7,72	2,26	0,30	0,15	5,85	0,20	0,10	0,04
Адипиновая + NaP	Трегалоза	8,59	2,47	0,30	0,02	5,81	0,04	0,10	0,03
Яблочная	Глицин	6,60	0,07	0,31	0,01	6,05	0,24	0,22	0,01
Яблочная	Манит	6,48	0,21	0,26	0,06	6,16	0,24	0,17	0,06
Яблочная	Нет	5,95	0,16	0,18	0,03	5,90	0,19	0,15	0,04
Яблочная	Сорбит	6,36	0,08	0,25	0,01	6,10	0,33	0,17	0,08
Яблочная	Сахароза	7,74	1,99	0,29	0,07	6,82	1,21	0,15	0,01
Яблочная	Трегалоза	6,93	0,02	0,32	0,00	6,20	0,19	0,24	0,06
Яблочная + Лимонная	Глицин	6,35	0,18	0,25	0,02	5,79	0,08	0,11	0,02
Яблочная + Лимонная--	Манит	6,49	0,28	0,26	0,04	7,68	1,72	0,31	0,12
Яблочная + Лимонная	Нет	6,12	0,38	0,20	0,09	5,75	0,23	0,09	0,06
Яблоч-	Сорбит	6,19	0,14	0,23	0,05	5,91	0,01	0,11	0,00

ная + Лимонная									
Яблочная + Лимонная	Сахароза	6,16	0,33	0,19	0,07	5,94	0,01	0,14	0,05
Яблочная + Лимонная	Трегалоза	6,61	0,25	0,26	0,05	8,14	3,05	0,16	0,00
Винная	Глицин	6,39	0,46	0,24	0,06	5,95	0,16	0,15	0,04
Винная	Маннит	6,20	0,09	0,20	0,01	24,62	20,25	0,43	0,14
Винная	Нет	6,05	0,18	0,18	0,06	6,27	0,47	0,23	0,03
Винная	Сорбит	6,39	0,08	0,24	0,01	32,57	12,48	0,39	0,08
Винная	Сахароза	6,29	0,32	0,23	0,05	8,22	2,79	0,20	0,10
Винная	Трегалоза	6,55	0,25	0,26	0,05	6,57	0,01	0,27	0,01
Винная + Лимонная	Глицин	6,32	0,19	0,24	0,03	5,86	0,03	0,11	0,02
Винная + Лимонная	Маннит	6,36	0,31	0,24	0,06	12,89	0,96	0,45	0,33
Винная + Лимонная	Нет	6,17	0,07	0,22	0,01	6,71	1,18	0,20	0,04
Винная + Лимонная	Сорбит	6,53	0,18	0,28	0,02	12,41	6,32	0,31	0,08
Винная + Лимонная	Сахароза	6,22	0,16	0,21	0,05	5,98	0,10	0,16	0,01
Винная + Лимонная	Трегалоза	6,12	0,13	0,19	0,02	13,61	10,30	0,25	0,01

Таблица 7

Исследование стабильности методом SE-HPLC по результатам определения степени чистоты и суммы пиков агрегации (AP)

Буфер	Контроль (NaP/цитрат)	Адипиновая кислота	Винная кислота	Глутаминовая кислота	Уксусная кислота	Янтарная кислота
Контролируемый параметр	Степень чистоты и связанные вещества, определенные методом SE-HPLC; степень чистоты в % площади					
Температура	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C
Начальная	99,3	99,2	99,3	99,3	99,3	99,2
Через 6 недель	99,2	99,2	99,2	99,0	99,1	99,0
Через 3 месяца	99,2	99,3	99,2	99,3	99,3	99,2
Температура	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Начальная	99,3	99,2	99,3	99,3	99,3	99,2
Через 6 недель	97,7	97,7	97,7	97,8	97,8	97,8
Через 3 месяца	97,1	97,2	97,1	97,2	97,2	97,1
Температура	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C
Начальная	99,3	99,2	99,3	99,3	99,3	99,2
Через 3 недели	95,9	96,2	95,7	96,0	95,9	95,9
Через 6 недель	93,6	94,3	93,5	93,9	93,7	93,8
Через 3 месяца	89,4	90,5	89,3	90,0	89,9	90,0
Контролируемый параметр	Степень чистоты и связанные вещества, определенные методом SE-HPLC; сумма AP/растворимые агрегаты, обнаруженные методом SEC, в % площади					

Температура	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C
Начальная	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Через 6 недель	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,5
Через 3 месяца	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7
Температура	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Начальная	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Через 6 недель	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Через 3 месяца	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8
Температура	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C
Начальная	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Через 3 недели	1,0	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9
Контролируемый параметр	Степень чистоты и связанные вещества, определенные методом SE-HPLC; степень чистоты в % площади					
Через 6 недель	1,5	1,4	1,5	1,4	1,6	1,5
Через 3 месяца	1,8	1,6	1,8	1,6	1,5	1,2

Таблица 8

Исследование стабильности методом MFI по результатам определения общего числа частиц размером 5-10 мкм и >10 мкм

Контроль (NaP/цитрат)	Адипиновая кислота	Винная кислота	Глутаминовая кислота	Уксусная кислота	Янтарная кислота
Счет обнаруженных методом проточной микроскопии (визуализации микропотоков, MFI) невидимых частиц размером 5-10 мкм на мл					
2296	1874	1483	1507	1520	881
Счет обнаруженных методом проточной микроскопии (визуализации микропотоков, MFI) невидимых частиц размером более 10 мкм на мл					
127	257	86	98	107	139

Данные, полученные через 3 месяца хранения при 40°C

Таблица 9

Два примера предпочтительных композиций согласно изобретению

Соединение	[мг/мл]
Химерный, гуманизированный или человеческий IgG	50,00
NaCl	5,0-7,0
Маннит	10,0-14,0
Адипиновая кислота	1,5-4,0
Tween 80	0,5-1,5
NaOH (для корректировки pH)	Сколько необходимо
pH	5,20
Соединение	[мг/мл]
Химерный, гуманизированный человеческий IgG	50,00
NaCl	5,0-7,0
Маннит	10,0-14,0
Уксусная кислота	0,5-1,5
Tween 80	0,5-1,5
NaOH (для корректировки pH)	Сколько необходимо
pH	5,20

В Таблице 10 представлены особо предпочтительные композиции, содержащие адипиновую кислоту или уксусную кислоту (ацетат). Эти композиции сравнили с

контрольным буфером, содержащим фосфат натрия + цитрат (14,1 мМ фосфата натрия, 7,2 мМ цитрата, 105,5 мМ NaCl, 0,1% Tween 80 и 65,9 мМ маннита, подробнее смотри выше). Все представленные композиции превосходили контрольный буфер с точки зрения характеристик агрегации.

Таблица 10

Предпочтительные композиции, содержащие адипиновую кислоту или ацетат

№ исследования	001		007		
	Композиция адипиновой кислоты	Композиция уксусной кислоты	Композиция адипиновой кислоты	Композиция адипиновой кислоты/ цитрата	Композиция уксусной кислоты
NaCl [мМ]	105	105	105	105	105
Маннит [мМ]	66	66	66	66	66
Адипиновая кислота [мМ]	23	-	23	23	0,2
Уксусная кислота [мМ]	-	20	-	-	20
Tween 80 [мМ]	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Лимонная кислота [мМ]	1,4	2,4	-	1,4	2,4
Фосфат [мМ]	2,8	2,8	-	-	-

Формула изобретения

1. Стабильная фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело против TNFα или его фрагмент с сохраненной способностью связывать мишень и адипиновую кислоту или адипат, где адипиновая кислота или адипат действуют в качестве буфера.

2. Композиция по п. 1, дополнительно содержащая, по меньшей мере, один стабилизатор, выбранный из группы, состоящей из аминокислоты, сахарного полиола, дисахарида и полисахарида.

3. Композиция по п. 2, где дисахарид представляет собой агент, выбранный из группы, состоящей из сахарозы и трегалозы.

4. Композиция по п. 2, где сахарный полиол представляет собой агент, выбранный из группы, состоящей из маннита и сорбита.

5. Композиция по п. 1, приводящая к пониженной агрегации указанных антитела или фрагмента в водном растворе.

6. Композиция по п. 1, где указанные антитело или фрагмент представляют собой, по меньшей мере, одно антитело или его фрагмент, выбранные из группы, состоящей из:

антитела, полученного из гибридомы,

химеризованного антитела,

гуманизированного антитела и

человеческого антитела.

7. Композиция по п. 1, где указанное антитело представляет собой IgG.

8. Композиция по любому из пп. 1-7, содержащаяся в предварительно заполненных шприце или ланцете, флаконе или инфузионном мешке.

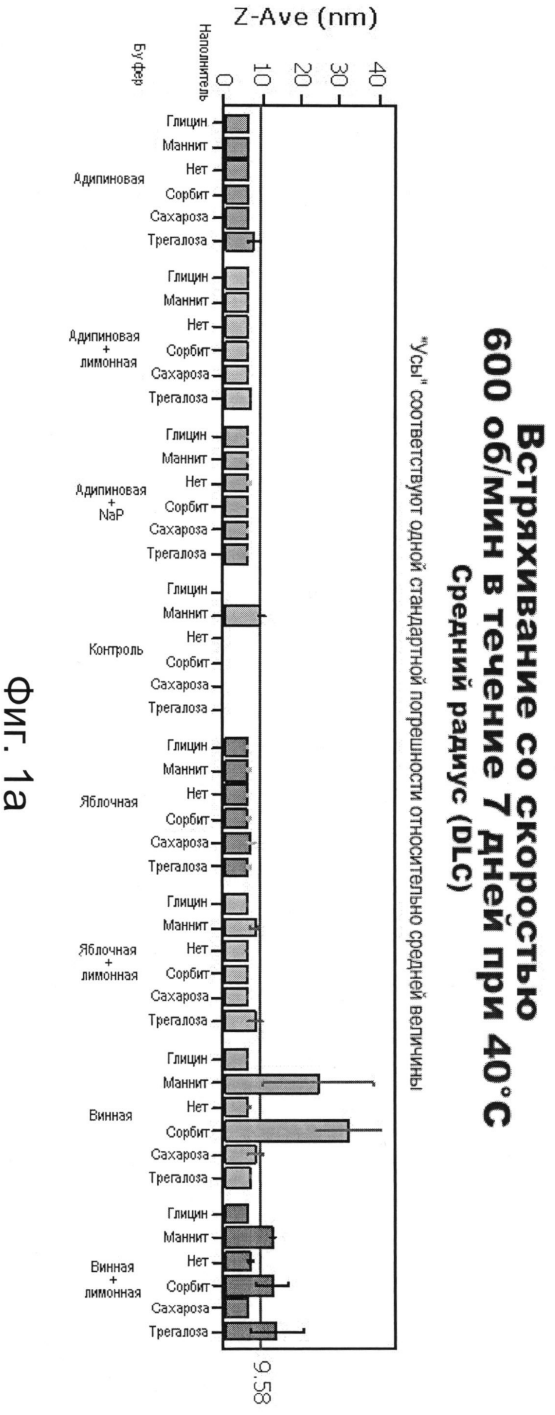
9. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 1-8 для лечения, по меньшей мере, одного патологического состояния, выбранного из группы, включающей:

аутоиммунные болезни,

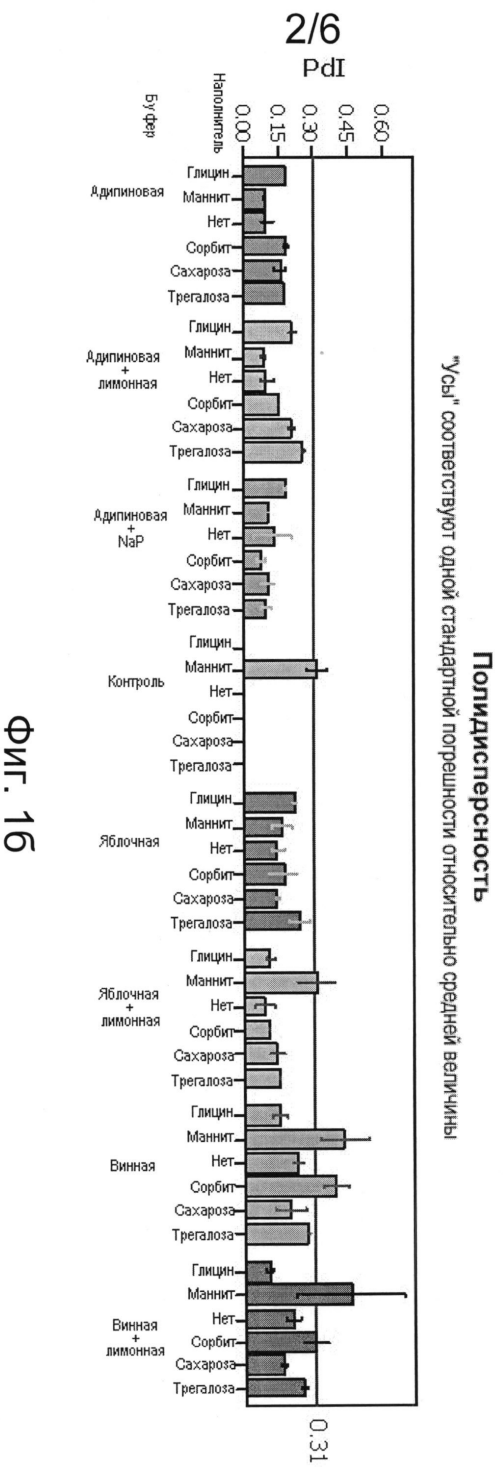
инфекционные болезни,

неопластические и/или злокачественные заболевания (рак) и болезни нервной системы.

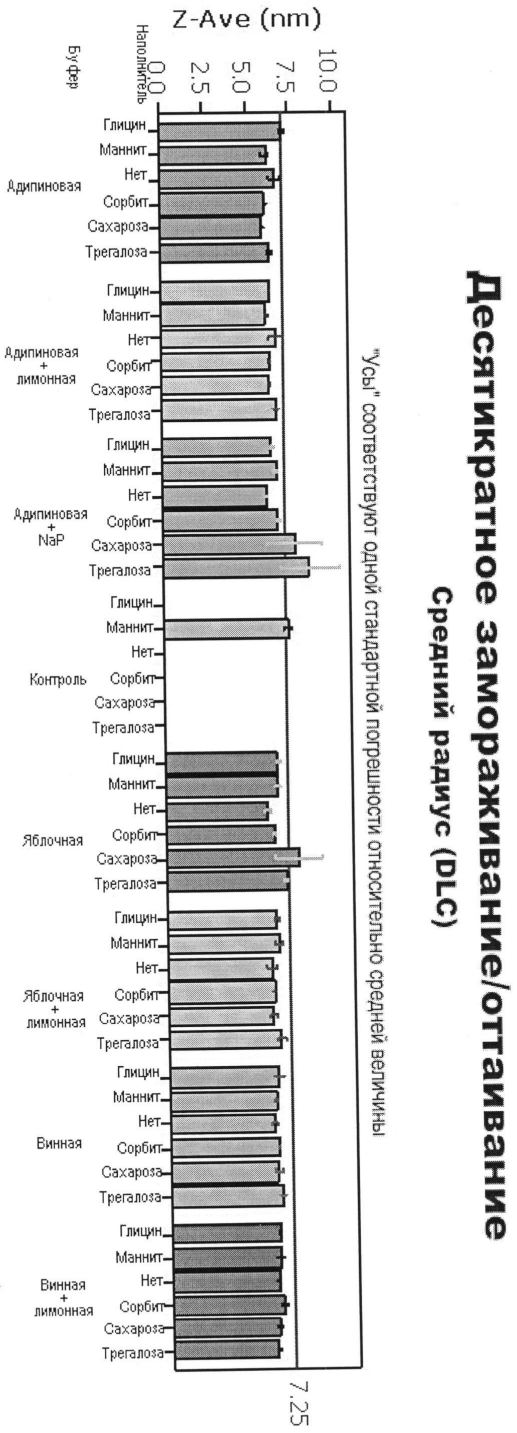
1/6


Встряхивание со скоростью
600 об/мин в течение 7 дней при 40°C
Средний радиус (DLC)
"Усы" соответствуют одной стандартной погрешности относительно средней величины
Z-Ave (nm)
0
10
20
30
40
9.58
Буфер
Наполнитель
Адипиновая
Адипиновая + лимонная
Адипиновая + NaP
Контроль
Яблочная
Яблочная + лимонная
Винная
Винная + лимонная
Глицин
Маннит
Нет
Сорбит
Сахароза
Трегалоза

Фиг. 1а


2/6
PdI
Буфер
Наполнитель
0.00
0.15
0.30
0.45
0.60
Адипиновая
Адипиновая + лимонная
Адипиновая + NaP
Контроль
Яблочная
Яблочная + лимонная
Винная
Винная + лимонная
Глицин
Маннит
Нет
Сорбит
Сахароза
Трегалоза
0.31
Полидисперсность
"Усы" соответствуют одной стандартной погрешности относительно средней величины

Фиг. 1б


Десятикратное замораживание/оттаивание
Средний радиус (DLC)
"Усы" соответствуют одной стандартной погрешности относительно средней величины
Z-Ave (nm)
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
7.25
Буфер
Наполнитель
Адипиновая
Адипиновая + лимонная
Адипиновая + NaP
Контроль
Яблочная
Яблочная + лимонная
Винная
Винная + лимонная
Глицин
Маннит
Нет
Сорбит
Сахароза
Трегалоза

Фиг. 2а

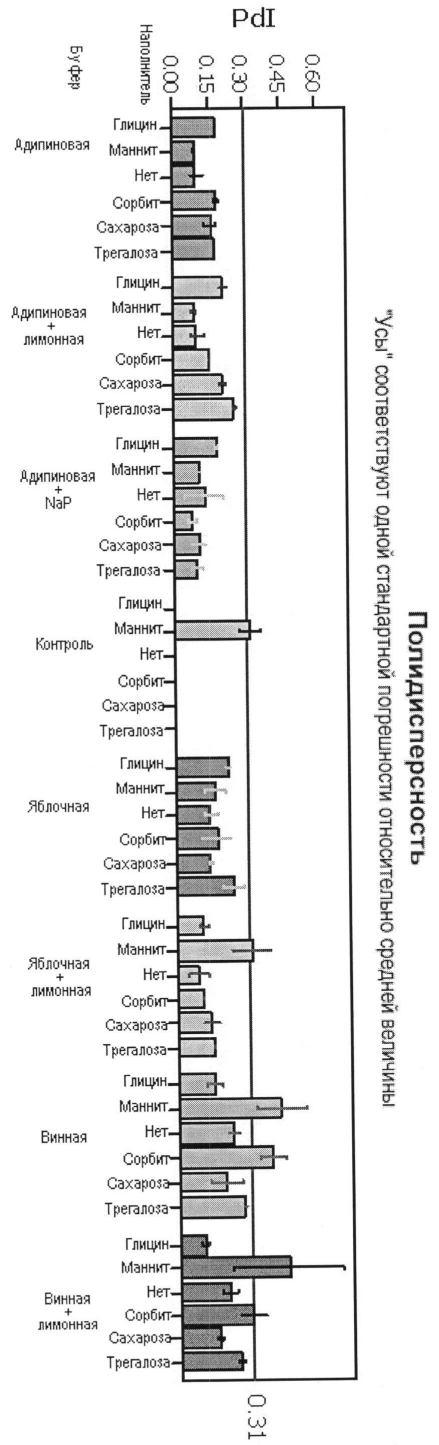
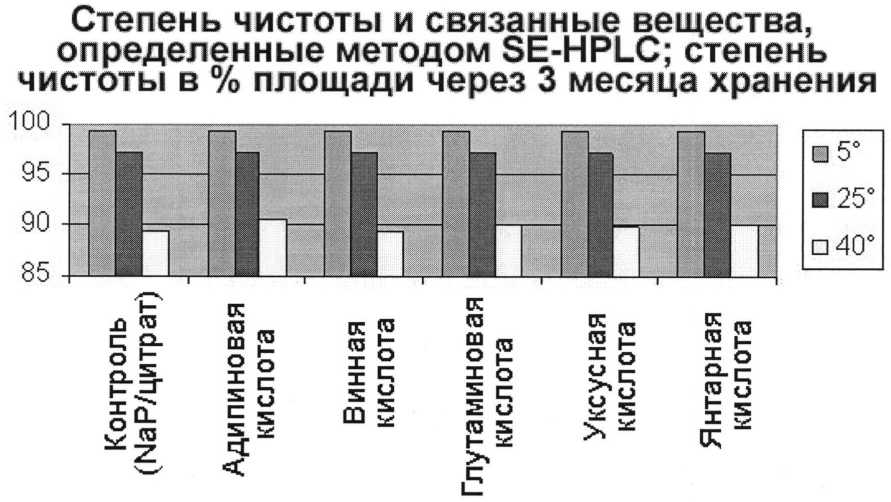
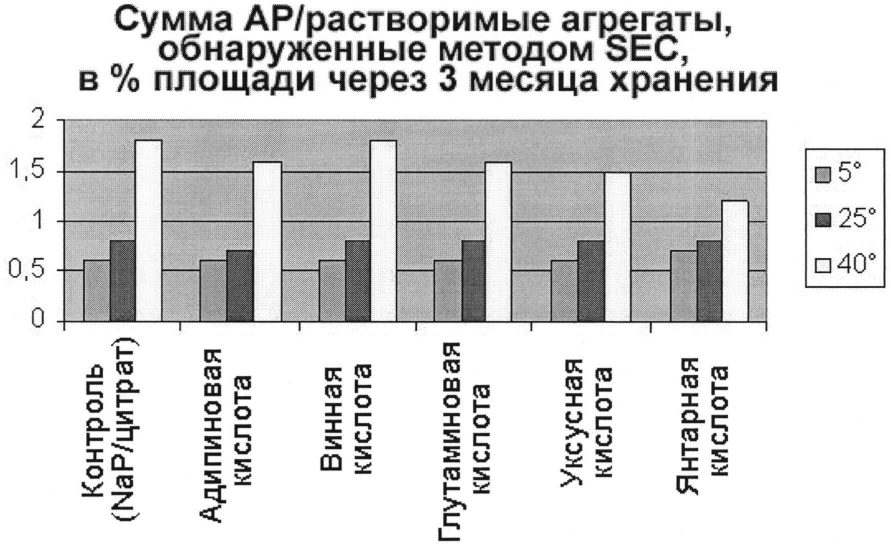

PdI
0.00
0.15
0.30
0.45
0.60
0.31
Буфер
Наполнитель
Адипиновая
Адипиновая + лимонная
Адипиновая + NaP
Контроль
Яблочная
Яблочная + лимонная
Винная
Винная + лимонная
Глицин
Маннит
Нет
Сорбит
Сахароза
Трегалоза
Полидисперсность
"Усы" соответствуют одной стандартной погрешности относительно средней величины

Fig. 2b


Степень чистоты и связанные вещества, определенные методом SE-HPLC; степень чистоты в % площади через 3 месяца хранения
100
95
90
85
5°
25°
40°
Контроль (NaP/цитрат)
Адипиновая кислота
Винная кислота
Глутаминовая кислота
Уксусная кислота
Янтарная кислота

Фиг. 3а


Сумма АР/растворимые агрегаты, обнаруженные методом SEC, в % площади через 3 месяца хранения
2
1,5
1
0,5
0
5°
25°
40°
Контроль (NaP/цитрат)
Адипиновая кислота
Винная кислота
Глутаминовая кислота
Уксусная кислота
Янтарная кислота

Фиг. 3б


Счет обнаруженных методом проточной микроскопии (визуализации микропотоков, MFI) невидимых частиц размером 5-10 мкм на мл при 40°C
2500
2000
1500
1000
500
0
Контроль
Адипиновая кислота
Винная кислота
Глутаминовая кислота
Уксусная кислота
Янтарная кислота

Фиг. 4а


Счет обнаруженных методом проточной микроскопии (визуализации микропотоков, MFI) невидимых частиц размером более 10 мкм на мл при 40°C
300
200
100
0
Контроль
Адипиновая кислота
Винная кислота
Глутаминовая кислота
Уксусная кислота
Янтарная кислота

Фиг. 4б

Перечень последовательностей

<110> ГЕКСАЛ АГ

<120> ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО
<130> LD40322

<160> 10
<170> Патент в версии 3.5

<210> 1
<211> 1413
<212> DNA
<213> Искуственная

<220>
<223> Последовательность, кодирующая тяжелую цепь IgG против TNFalpha
<400> 1
atggcctggg tctggaccct gcctttcctg atggccgctg cccagtccgt gcaggccgag 60

gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gccggtccct gcggctgtcc 120

tgcgccgcct ccggcttcac cttcgacgac tacgccatgc actgggtccg ccaggccccc 180

ggcaaaggcc tcgagtgggt gtccgccatc acctggaact ccggccacat cgactacgcc 240

gactccgtgg agggccggtt caccatctcc cgggacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccaa ggtgtcctac 360

ctgtccaccg cctcctccct ggactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc 420

gcctccacca agggcccctc cgtgttccct ctggcccctt cctccaagtc cacctccggc 480

ggcaccgccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 540

tggaactctg gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 600

ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtcaca gtgccttcct ccagcctggg cacccagacc 660

tacatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 720

aagtcctgcg acaagaccca cacctgccct ccctgccctg cccctgagct gctgggcgga 780

ccttccgtgt tcctgttccc tcctaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct 840

gaggtcacct gcgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggatc ctgaggtcaa gttcaattgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgct aagaccaagc ctcgggaaga gcagtacaac 960

tccacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 1020

gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaggccaagg gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcctccctc ccgggacgag 1140

ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtcaagg gcttctaccc ttccgatatc 1200

gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccggtgg 1320

cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1380

cagaagtccc tgtccctgag ccctggcaag tga 1413

Страница

<210> 2
<211> 705
<212> DNA
<213> Искуственная

<220>
<223> Последовательность, кодирующая легкую цепь IgG против TNFalpha
<400> 2
atgtccgtgc tgacccaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccagatgc 60

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgcc gggcctccca gggcatccgg aactacctgg cctggtatca gcagaagcct 180

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgcc gcctccaccc tgcagtccgg cgtgccttcc 240

cggttctccg gctccggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctgcagcct 300

gaggacgtgg ccacctacta ctgccagcgg tacaacagag ccccttacac cttcggccag 360

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctcctt ccgtgttcat cttccctccc 420

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtct gcctgctgaa caacttctac 480

cctcgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caactcccag 540

gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtccag caccctgacc 600

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtcac ccaccagggc 660

ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gctga 705

<210> 3
<211> 470
<212> PRT
<213> Искуственная

<220>
<223> Аминокислотная последовательность тяжелой цепи IgG против TNFalpha

<400> 3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

```
          100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
```

370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 4
<211> 234
<212> PRT
<213> Икуственная

<220>
<223> Аминокислотная последовательность легкой цепи IgG против TNFalpha

<400> 4

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45

Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn
100 105 110

Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Икуственная

<220>
<223> Аминокислотная последовательность CDR 3 легкой цепи IgG против TNFalpha

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Xaa может означать любую встречающуюся в природе аминокислоту

<400> 5

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Аминокислотная последовательность CDR 3 тяжелой цепи IgG против TNFalpha

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> Xaa может означать любую встречающуюся в природе аминокислоту

<400> 6

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Икуственная

<220>
<223> ААминокислотная последовательность CDR 2 легкой цепи IgG против TNFalpha

<400> 7

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Икуственная

<220>
<223> Аминокислотная последовательность CDR 2 тяжелой цепи IgG против TNFalpha

<400> 8

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ААминокислотная последовательность CDR 1 легкой цепи IgG против TNFalpha
<400> 9

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Икуственная

<220>
<223> Аминокислотная последовательность CDR 1 тяжелой цепи IgG против TNFalpha

<400> 10

Asp Tyr Ala Met His
1 5