



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 38/27 (2006.01)*A61K 38/30* (2006.01)*A61K 47/18* (2006.01)*A61K 47/00* (2006.01)*A61K 9/08* (2006.01)*A61J 3/00* (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012124985/15, 17.11.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.11.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
17.11.2009 US 61/261,859

(43) Дата публикации заявки: 27.12.2013 Бюл. № 36

(45) Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 1991/018621 A1, 12.12.1991. US
6767892 B1, 27.07.2004. WO 2006/130769 A2,
07.12.2006. EP 1369125 A1, 10.12.2003(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 18.06.2012(86) Заявка РСТ:
EP 2010/006996 (17.11.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/060922 (26.05.2011)

Адрес для переписки:

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

(72) Автор(ы):

ГОПИНАТ Энона (US),
ПАРК Съюзан (US),
АРАКАВА Цутому (US),
РИШАР Жозель (FR),
ФЭ Фабио (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ИПСЕН ФАРМА С.А.С. (FR)

(54) ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ДЛЯ КОМБИНАЦИИ hGH И rhIGF-1

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтике. Описана лекарственная форма комбинированных композиций гормона роста (GH) и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1). Композиция включает средство, предупреждающее агрегирование, гистидиновый или цитратный буфер, неионное поверхностно-активное вещество, также необязательно содержит консервант, модификатор тоничности

или наполнитель. В качестве средства, предупреждающего агрегирование, используется аргинин. В качестве модификатора тоничности - хлорид натрия. Также раскрывается способ получения композиции. Изобретение обеспечивает стабильные прозрачные фармацевтические композиции без образования агрегатов. 3 н. и 15 з.п. ф-лы, 2 ил., 14 табл., 10 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 558 821** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 38/27 (2006.01)

A61K 38/30 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61J 3/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012124985/15**, 17.11.2010

(24) Effective date for property rights:
17.11.2010

Priority:

(30) Convention priority:
17.11.2009 US 61/261,859

(43) Application published: **27.12.2013** Bull. № 36

(45) Date of publication: **10.08.2015** Bull. № 22

(85) Commencement of national phase: **18.06.2012**

(86) PCT application:
EP 2010/006996 (17.11.2010)

(87) PCT publication:
WO 2011/060922 (26.05.2011)

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**GOPINAT Ehnona (US),
PARK S'juzan (US),
ARAKAVA Tsutomu (US),
RIShAR Zhoehl' (FR),
FEh Fabio (FR)**

(73) Proprietor(s):

IPSEN FARMA S.A.S. (FR)

(54) **DRUG FORM FOR hGH AND rhIGF-1 COMBINATION+**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceuticals. Described is drug form of combined compositions of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF-1). Composition includes aggregation-preventing substance, histidine or citrate buffer, non-ionic surface-active substance, and optionally contains preservative, tonicity modifier or filler. As aggregation-preventing

substance arginine is used, with sodium chloride being used as tonicity modifier. Method of composition obtaining is also disclosed.

EFFECT: invention provides stable transparent pharmaceutical compositions without formation of aggregates.

18 cl, 2 dwg, 14 tbl, 10 ex

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к лекарственным формам комбинированных композиций гормона роста (GH) и инсулиноподобного фактора роста (IGF-1). Эти комбинированные композиции предоставляют стабильные жидкие фармацевтические композиции без образования видимых нерастворимых агрегатов при желаемом pH.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет лекарственную форму для инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) и гормона роста (GH), где белки могут быть приготовленными совместно в инъектируемой форме или они могут быть приготовленными отдельно с последующим смешиванием перед введением в единой дозируемой инъектируемой форме.

Инсулиноподобный гормон роста относится к семейству полипептидов, известных как соматомедины; он представляет собой полипептид, естественно присутствующий в жидкостях тела человека. Большинство тканей (особенно печень) продуцируют IGF-1 совместно со специфическими белками, связывающими IGF. IGF-1 стимулирует рост и деление разнообразных типов клеток, в частности, во время индивидуального развития; таким образом, уровень IGF-1 влияет на такие процессы, как рост скелета и репликация клеток. Эти молекулы находятся под контролем гормона роста (GH).

IGF-1 является первичным белковым гормоном, опосредующим эффекты GH, стимулирующие рост костей. IGF-1 продуцируется в ответ на GH и затем он индуцирует последующие клеточные реакции, включая клеточные реакции в кости. IGF-1 состоит из 70 аминокислот в единственной цепи с тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. IGF-1 имеет молекулярную массу 7649 Да; он продуцируется, прежде всего, в печени в качестве эндокринного гормона, а также в тканях-мишенях паракринным/ аутокринным образом. IGF-1 производят рекомбинантно (rhIGF-1) в крупном масштабе, используя как дрожжи, так и *E. coli*.

Гормон роста, или человеческий ростовой гормон (hGH), представляет собой одноцепочечный полипептид, состоящий из 191 аминокислоты. Дисульфидные связи соединяют положения 53 и 165 и 182 и 189. Человеческий GH является сильным анаболическим средством. К наиболее значительным его эффектам, проявляющимся при его введении субъектам с гипопитарной недостаточностью (дефицитом GH), относится ускоренный линейный рост хряща в зоне роста кости, результатом чего является увеличение общего роста тела.

В международной заявке на патент W09118621 описан благоприятный и синергичный эффект, производимый комбинацией обоих белков. Совместное введение IGF-1 и GH млекопитающему способствует большему росту, чем рост, достигаемый при одиночном применении IGF-1 или GH. Это увеличение равняется сумме роста, наблюдаемого тогда, когда вводят IGF-1, и роста, наблюдаемого тогда, когда вводят GH.

Способы и композиции, предназначенные для повышения скорости роста, раскрыты также в международной заявке на патент WO 2006/130769. Это исследование относилось существенно к способу лечения, а его результаты были сфокусированы на реакции пациента. Описаны фармацевтические композиции - в частности, смесь IGF-1 и GH, составленная с маннитом, глицином и/или фосфатом при pH 7,4. Если смесь необходимо хранить, ее составляют в буфере, таком как цитрат, при pH примерно 6 с поверхностно-активным веществом, повышающим растворимость GH при этом pH, таком как полисорбат 20 или полуксамер 188. Указанная заявка также описывает возможность добавления неорганической соли и стабилизатора. В рецептурах, раскрытых в WO 2006/130769, не применяют никаких средств, предупреждающих агрегирование.

При комбинировании двух белков в растворе часто возникают осложнения, заключающиеся в появлении комплексов, образуемых белок-белковыми взаимодействиями. На образование таких комплексов особенно влияет изменение концентрации, температуры, pH и буфера в растворах, содержащих белки. Белковые комплексы могут затем образовывать нерастворимые агрегаты, результатом чего является утрата действенности и активности белков.

Кроме того, в фармацевтических препаратах важна доза терапевтического белка, которая должна находиться в пределах контролируемых диапазонов в течение длительного периода времени. Для получения и поддержания правильной концентрации белка в растворе и особенно для растворения больших количеств белков, часто требуется применение солюбилизаторов. Патент США № 6767892 раскрыл фармацевтические композиции IGF-1 и его аналогов, содержащие такие солюбилизирующие соединения, как аргинин, N-ацетиларгинин или гидрохлорид гуанидина. Композиции испытаны, предоставлены сравнительные данные с повышенной растворимостью IGF-1 при pH более 5,0 и температурах холодильного шкафа. Однако указанный документ не раскрывает никаких композиций содержащих IGF-1, комбинированный с другими терапевтическими белками.

Целью настоящего изобретения является получение жидких препаратов, содержащих как IGF-1, так и гормон роста (GH), стабильных при 4°C в течение не менее 30 дней без какого бы то ни было значительного агрегирования, свидетельством чего является видимая прозрачность раствора. Дополнительной целью настоящего изобретения является способ получения жидких препаратов, содержащих как IGF-1, так и GH.

Описание фигур:

Фигура 1 показывает наложенные друг на друга профили скорости седиментации, полученные при аналитическом ультрацентрифугировании раствора IGF-1, растворов GH и смеси двух растворов (1:1). Первый набор таких профилей (фигура 1), получали с белками, приготовленными в 25 мМ цитратном буфере при pH 6; он свидетельствует о существенной взаимной ассоциации этих белков.

Фигура 2 показывает профили седиментации растворов, включающих в себя ион аргининия (аргинин в концентрации 100 мМ). Эти профили показывают, что присутствие аргинина вызывает изменения, свидетельствующие о том, что в растворах уменьшилось количество агрегатов с высокой молекулярной массой.

Следующие определения даны для того, чтобы проиллюстрировать и определить смысл и объем терминов, используемых для описания настоящего изобретения в данном документе.

Согласно настоящему изобретению, термин «средство, предупреждающее агрегирование», относится к соединениям, которые предотвращают или уменьшают образование нерастворимых белковых агрегатов, когда белки вводят в раствор.

Термин «IGF-1» относится к инсулиноподобному фактору роста 1 из многих видов, включая, но не ограничиваясь ими, бычий, овечий, свиной, птичий и, предпочтительно, человеческий IGF-1 в нативной последовательности или в вариантной форме и из любого природного, синтетического или рекомбинантного источника.

Предпочтительно, IGF-1 производят рекомбинантно, как описано, например, в патенте США № 6331414. Более предпочтительно, IGF-1 представляет собой активный фармацевтический ингредиент в продукте, коммерчески предоставляемом на рынке в виде препарата INCRELEX™.

Термин «rhIGF-1» относится к рекомбинантному человеческому IGF-1.

Термин «GH» относится к гормону роста из любых видов, включая, но не

ограничиваясь ими, бычий, овечий, свиной, птичий и, предпочтительно, человеческий hGH в нативной последовательности или в вариантной форме и из любого природного, синтетического или рекомбинантного источника.

Термины «гормон роста человека» и «hGH» относятся к гормону роста человека, производимого способами, включающими в себя экстракцию и очистку из природного источника и применение систем рекомбинантных клеточных культур, как описано, например, в научной публикации «*Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone*» Goeddel & al, *Nature* Vol. 281, October 1979.

Последовательность hGH дана, например, в Hormone Drugs, Gueriguian et al., USP convention, Rockville, MD (1982). Термины также охватывают биологически активные эквиваленты человеческого гормона, например, включающие одну или более отличающихся аминокислот в общей последовательности. Кроме того, термины, используемые в настоящей заявке, должны охватывать замены, делеции и вставки вариантов аминокислот в hGH, т.е. аналоги и/или гомологи hGH или множественные формы hGH с посттрансляционными модификациями. Часто применяют два вида: нативный вид, состоящий из 191 аминокислоты (соматотропин), и вид, содержащий 192-ую аминокислоту (N-концевой метионин); оба вида обычно получают рекомбинантным путем.

Предпочтительно применять метионилированный гормон роста человека (met-hGH), продуцируемый в *E. coli*, который Genentech Inc. продает под торговым наименованием PROTROPIN[®] и который идентичен природному полипептиду, за исключением присутствия N-концевого остатка метионина. Также предпочтителен рекомбинантный hGH, доступный у Genentech, Inc. под торговым наименованием NUTROPIN[®]. Более предпочтительным является жидкий рекомбинантный rhGH для инъекций, доступный у Genentech, Inc. под торговым наименованием NUTROPIN AQ[®].

Термин «буфер», используемый в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемый буфер, который, предпочтительно, предоставляет pH 5-6,5. Подходящие буферы включают в себя, но не ограничиваются ими, ацетатные буферы, цитратные буферы, фосфатные буферы, сукцинатные буферы и аминокислотные буферы, такие как гистидиновые буферы, и все их соли.

Термин «консервант», используемый в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, предотвращающее разрушение, обусловленное ростом микроорганизмов, или нежелательным химическим изменением.

Термин «поверхностно-активное вещество», используемый в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, дающее возможность создавать дисперсию или суспензию, посредством уменьшения поверхностного натяжения растворителя (такого как вода) или межфазного натяжения между двумя несмешивающимися жидкостями. Подходящими поверхностно-активными веществами являются, например, неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты или полуксамеры.

Термин «наполнитель», используемый в настоящем документе, означает фармацевтически приемлемое вещество, применяемое для увеличения количества твердых веществ, которое представляет собой, например, сахарозу, трегалозу и маннит (но не ограничивается перечисленными веществами).

Термин «модификатор тоничности» относится к изотоническому модификатору или осмотическому регулятору или осмолиту, который придает осмоляльность буферному раствору. Термин «осмоляльность» относится к общей осмотической активности,

придаваемой ионами и неионными молекулами раствору, содержащему неорганические соли (такие как хлорид натрия и хлорид калия), полиэтиленгликоли (ПЭГи), полипропиленгликоль, глицин, глицерин.

Термин «лиофилизированный», используемый в настоящем документе, относится к препарату, который был подвергнут процессу, известному в данной области техники как сушка из замороженного состояния, включающему в себя замораживание препарата и последующее удаление льда из замороженного содержимого.

Термин «аминокислота», используемый в настоящем документе, означает аминокислоту (свободную аминокислоту, т.е. не аминокислоту в пептиде или в белковой последовательности). Аминокислоты, используемые в настоящем изобретении, включают в себя, но не ограничиваются ими, например, аргинин, глицин, лизин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, триптофан, серин, метионин и пролин.

Термин «IRF», или «лекарственная форма с немедленным высвобождением», относится к лекарственной композиции или смеси лекарственных композиций, предпочтительно, в жидкой форме, в которой нет никаких носителей, регулирующих биодоступность активного вещества лекарственного средства для тканей в месте введения в организме пациента.

Термин «средство, предупреждающее агрегирование», используемый в настоящем документе, относится к продукту, который предупреждает взаимодействие белков с образованием комплексов и/или агрегатов, когда их смешивают в растворе.

Согласно настоящему изобретению, фармацевтическая композиция содержит rhIGF-1 и rhGH и

- средство, предупреждающее агрегирование;
 - буфер;
 - поверхностно-активное вещество;
 - необязательно, консервант; и
 - необязательно, модификатор тоничности или наполнитель,
- где средство, предупреждающее агрегирование, присутствует в композиции в концентрации, составляющей не менее 80 мМ.

Характерной особенностью фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению является то, что два активных ингредиента (IGF-1 и GH) присутствуют в едином препарате. Термин «единый препарат», используемый в настоящем документе, также относится к «совместному препарату» или к «совместной смеси». Термины «совместный препарат» или «совместная смесь» в настоящем документе используются взаимозаменяемым образом.

Предпочтительно, два активных ингредиента представляют собой человеческие IGF-1 и GH, в настоящем документе также называемые hIGF-1 и hGH. Кроме того, предпочтительно, чтобы оба активных ингредиента производились рекомбинантными средствами.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению является жидкой композицией. Кроме того, предпочтительно, чтобы она являлась многодозовой композицией. В варианте осуществления многодозовой композиции, предпочтительно, присутствует консервант.

В следующем аспекте настоящее относится к способам получения фармацевтической композиции, содержащей IGF-1 и GH. Один способ согласно настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции можно осуществлять следующим образом:

- а) Приготовление раствора hGH в буфере при pH 5-6,5, содержащем средство,

предупреждающее агрегирование, модификатор тоничности или наполнитель;

б) Приготовление раствора IGF-1 посредством диализа препарата IGF-1 против буфера, используемого на стадии (а), содержащего указанные средство,

предупреждающее агрегирование, модификатор тоничности или наполнитель;

с) Добавление поверхностно-активного вещества и, необязательно, консерванта к обоим основным растворам; и

д) Смешивание растворов hGH и IGF-1.

В вариантах осуществления этого способа, на стадии (а) лиофилизированный hGH растворяют в буфере или в жидком препарате hGH (например, в его растворе в бикарбонатном буфере с концентрацией приблизительно 20 мг/мл) буфер заменяют другим буфером (предпочтительно, цитратным, сукцинатным или гистидиновым) с обычным значением pH (предпочтительно, примерно 5-6,5), содержащим средство, предупреждающее агрегирование, концентрация которого составляет 80-200 мМ (предпочтительно, примерно 100-150 мМ), причем, необязательно, по меньшей мере, один раствор, приготовленный на любой из стадий (а), (б), (с) или (д) содержит консервант (предпочтительно, фенол или бензиловый спирт).

Термин «примерно», в контексте с количествами ингредиентов, представленных в настоящем документе, означает, что указанное количество может варьировать не более чем на +20% или не более чем на +15%, или не более чем на +10%, или не более чем на +5%.

На стадии (б) лиофилизированный IGF-1 растворяют в буфере или в жидком препарате IGF-1 (например, в растворе в цитратном буфере с концентрацией IGF-1, составляющей приблизительно 20-35 мг/мл), буфер заменяют другим буфером (предпочтительно, цитратным, сукцинатным или гистидиновым) с обычным значением pH (предпочтительно, примерно 5-6,5), содержащим средство, предупреждающее агрегирование, концентрация которого составляет примерно 80-200 мМ.

Затем смешивают два независимо приготовленных раствора.

Настоящее изобретение охватывает и альтернативный способ получения фармацевтической композиции.

Согласно настоящему изобретению, альтернативный способ получения фармацевтической композиции данного изобретения включает в себя:

а) Приготовление раствора I, посредством смешивания буфера (предпочтительно, гистидинового буфера), средства, предупреждающего агрегирование (предпочтительно, аргинина), предпочтительно, полисорбата 20, необязательно, консерванта

(предпочтительно, бензинового спирта), поверхностно-активного вещества и, необязательно, посредством доведения водой до нужного объема, причем раствор I имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения;

б) Приготовление раствора IGF-1 (раствора II), содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, которые применяют на стадии (а);

с) Добавление раствора II к раствору I для получения раствора III;

д) Приготовление раствора IV посредством смешивания буфера (предпочтительно, гистидина), средства, предупреждающего агрегирование (предпочтительно, аргинина), поверхностно-активного вещества (предпочтительно, полисорбата 20), консерванта (предпочтительно, бензинового спирта) и, необязательно, посредством доведения водой до нужного объема, причем раствор IV имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения;

е) Приготовление раствора GH (раствора V), содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, которые применяют на (д), причем GH, необязательно,

содержит натрий-бикарбонатный буфер;

f) Добавление раствора V к раствору IV для получения раствора VI;

g) Необязательно, независимое фильтрование растворов III и VI;

h) Смешивание профильтрованных растворов III и VI при отношении массы IGF-1 к массе GH, составляющем от примерно 1:1 до примерно 7:1 мас/масс, предпочтительно, 1,1:1 мас/мас, 3,3:1 мас/мас и 6,6:1 мас/мас для получения раствора VII; и

i) Необязательно, фильтрование раствора VII.

Стадии (b) и (e) можно проводить, например, посредством диафильтрации раствора, содержащего IGF-1 или GH, против подходящего раствора, содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, или против любого другого подходящего раствора для получения растворов II и IV.

В варианте осуществления настоящего изобретения раствор I и раствор IV являются идентичными. В этом варианте осуществления настоящего изобретения не применяют стадию (d), т.е. не готовят раствор IV, а раствор V просто смешивают с раствором I для получения раствора VI.

В варианте осуществления настоящего изобретения растворы II и IV могут содержать наполнитель, такой как, например, сахароза или маннит.

В варианте осуществления настоящего изобретения жидкий препарат лекарственного вещества GH (т.е. раствор, содержащий GH, предпочтительно, hGH и, более предпочтительно, rhGH) прямо смешивают с раствором IV, без какой бы то ни было замены буфера или диафильтрации против раствора, содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, согласно стадии (e), т.е. без проведения стадии (e), как описано выше.

Таким образом, в этом варианте осуществления настоящего изобретения указанный способ включает в себя следующие стадии:

a) Приготовление раствора I, посредством смешивания буфера, предпочтительно, гистидинового буфера, средства, предупреждающего агрегирование, предпочтительно, аргинина, предпочтительно, полисорбата 20, необязательно, консерванта, предпочтительно, бензилового спирта, поверхностно-активного вещества и, необязательно, посредством доведения водой до нужного объема, причем раствор I имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения;

b) Приготовление раствора IGF-1 (раствора II), содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, которые применяют на стадии (a);

c) Добавление раствора II к раствору I для получения раствора III;

d) Приготовление раствора IV посредством смешивания буфера, предпочтительно, гистидина, средства, предупреждающего агрегирование, предпочтительно, аргинина, поверхностно-активного вещества, предпочтительно, полисорбата 20, консерванта, предпочтительно, бензилового спирта и, необязательно, посредством доведения водой до нужного объема, причем раствор IV имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения;

e) - вариант: Добавление лекарственного вещества GH, необязательно, содержащего натрий-бикарбонатный буфер, к раствору IV для получения раствора VI;

f) Необязательно, независимое фильтрование растворов III и VI;

g) Смешивание профильтрованных растворов III и VI при отношении массы IGF-1 к массе GH, составляющем от примерно 1:1 до примерно 7:1 мас/масс, предпочтительно, 1,1:1 мас/мас, 3,3:1 мас/мас и 6,6:1 мас/мас для получения раствора VII; и

h) Необязательно, фильтрование раствора VII.

В осуществлении этого варианта указанного способа раствор I и раствор IV являются

идентичными. В этом варианте осуществления настоящего изобретения не применяют стадию (d), т.е. не готовят раствор IV, а лекарственное вещество GH просто смешивают с раствором I для получения раствора VI.

Предпочтительно, жидкий препарат лекарственного вещества hGH представляет собой раствор с концентрацией hGH, составляющей приблизительно 20 мг/мл, в бикарбонатном буфере с концентрацией, составляющей примерно 6-10 мМ, предпочтительно, 7,5 мМ, разбавленный без предварительной диафильтрации в буфере, предпочтительно, цитратном, сукцинатном или гистидиновом с обычным значением pH, предпочтительно, примерно 5-6,2 и, необязательно, содержащий средство, предупреждающее агрегирование, в концентрации примерно 80-200 мМ, предпочтительно, примерно 100-150 мМ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в жидком препарате IGF-1 (например, его растворе в 200 мМ цитратном буфере с концентрацией IGF-1, составляющей приблизительно 20-35 мг/мл) заменяют буфер на другой буфер, предпочтительно, цитратный, сукцинатный или гистидиновый буфер с обычным pH, предпочтительно, примерно 5-6,5, необязательно, содержащий средство, предупреждающее агрегирование, в концентрации примерно 80-200 мМ, предпочтительно, примерно 100-150 мМ. Затем смешивают два независимо приготовленных раствора.

Фильтрацию можно осуществлять, применяя любые подходящие средства - например, фильтры на целлюлозной основе или фильтры, изготовленные из PES (полиэфирсульфона). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фильтрацию всех растворов (до и после смешивания растворов) можно выполнять, применяя 0,22-микрометровые фильтры с низким сродством к белкам, такие, как например, фильтры, изготовленные из поливинилиденфторида (PVDF). Мембраны указанных фильтров, предпочтительно, имеют пределы по молекулярным массам, составляющие примерно 5 кДа или 3 кДа.

Преимущественно, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению являются стабильными не менее 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, 1 года или до 2 лет.

В следующем аспекте настоящее изобретение охватывает применение аргинина в качестве средства, предупреждающего агрегирование, в жидкой фармацевтической композиции, содержащей IGF-1 и GH, предпочтительно, hIGF-1 и hGH, более предпочтительно, rhIGF-1 и rhGH, где концентрация аргинина находится в диапазоне от примерно 80 мМ до примерно 200 мМ, т.е. составляет, например, примерно 80, примерно 90 мМ, примерно 100 мМ, примерно 110 мМ, примерно 120 мМ, примерно 130 мМ, примерно 140 мМ, примерно 150 мМ, примерно 160 мМ, примерно 170 мМ, примерно 180 мМ, примерно 190 мМ или 200 мМ.

Было обнаружено, что включение аминокислоты в фармацевтическую композицию дает возможность составлять смеси IGF-1 и GH в прозрачных лекарственных формах в виде растворов, без потери визуальной прозрачности смеси при последующем охлаждении при 2-8°C в течение не менее 30 дней (предпочтительно, в течение не менее 6 месяцев, более предпочтительно, в течение не менее 12 месяцев).

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственная форма является стабильной при хранении при температуре -20°C, или 2-8°C, в течение не менее 18 месяцев.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает стабильную, смешиваемую лекарственную форму, активными ингредиентами которой являются

человеческий инсулиноподобный фактор роста 1 (hIGF-1) и человеческий гормон роста (hGH). В предпочтительном варианте осуществления активные ингредиенты производят рекомбинантными средствами и обозначают rhIGF-1 и rhGH.

5 Лекарственные формы содержат rhIGF-1 и rhGH, средство, предупреждающее агрегирование, и буфер. Лекарственные формы могут содержать поверхностно-активное вещество, предпочтительно, неионное поверхностно-активное вещество, необязательно, консервант и, необязательно, модификатор тоничности и/или наполнитель.

10 Предпочтительной аминокислотой, дающей возможность составлять смеси IGF-1 и GH в прозрачной лекарственной форме в виде раствора, является аргинин или лизин (более предпочтительно, аргинин - например, в виде иона аргининия).

Предпочтительно, аминокислоту, которая действует в качестве средства, предупреждающего агрегирование, добавляют отдельно в каждый раствор до их смешивания в прозрачной лекарственной форме в виде раствора. Более предпочтительно, конечная концентрация средства, предупреждающего агрегирование, в прозрачном растворе присутствует в концентрационном диапазоне от примерно 80 мМ до примерно 200 мМ или в концентрационном диапазоне от примерно 100 мМ до примерно 180 мМ, или в концентрационном диапазоне от примерно 120 до примерно 160 мМ, или в концентрации, составляющей примерно 150 мМ.

20 Величину pH доводят до значения в диапазоне от примерно 5 до примерно 7, предпочтительно, от примерно 5,5 до примерно 6,5, более предпочтительно, от примерно 5,8 до 6,2. В контексте со значениями pH термин «примерно» означает, что значение pH может варьировать на $\pm 0,2$ или $\pm 0,1$. Значение pH некоторого раствора можно регулировать любыми подходящими средствами, такими как, например, добавление необходимого количества кислого раствора, такого как, например, раствор цитрата, или, предпочтительно, HCl.

30 Значение pH, применяемое согласно настоящему изобретению, может составлять, например, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 (предпочтительно, 5,8, 6,2 или примерно 6,5).

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, осмолитом или модификатором тоничности может быть неорганическая соль. Органическая соль, если она включена, может представлять собой, например, хлорид натрия или хлорид калия - предпочтительно, хлорид натрия, присутствующий в композиции в концентрации от 0 до 150 мМ, предпочтительно, в концентрации от 1 до 50 мМ.

В дополнение к этому можно выбрать необязательный консервант из следующего списка: фенол, бензиловый спирт, м-крезол, хлорбутанол. Предпочтительными консервантами являются фенол или бензиловый спирт. В композиции консервант может присутствовать в концентрации, составляющей примерно 0,1-5% по массе, предпочтительно, примерно 0,2-2% по массе или, еще более предпочтительно, примерно 1%.

40 Поверхностно-активное вещество, применяемое в композиции, раскрытой в настоящем изобретении, выбирают, например, из следующего списка: полисорбат (Tween) или полуксамер, такой как полисорбат 80, полисорбат 20 или полуксамер 188. Предпочтительно, поверхностно-активное вещество является неионным, более предпочтительно, оно представляет собой полисорбат (Tween), такой как полисорбат 80, полисорбат 20, или полуксамер, такой как полуксамер 188, более предпочтительно, полисорбат 20 или полуксамер 188, в концентрации, составляющей примерно 0,01-3% по массе, предпочтительно, примерно 0,03-0,50% по массе и, более предпочтительно, примерно 0,2% по массе.

В дополнение к этому, буфер можно выбирать из подходящих фармацевтически приемлемых буферов, предоставляющих рН 5-6,5, таких как цитрат натрия или гистидин или они оба; предпочтительны ацетатные буферы, цитратные буферы, фосфатные буферы, аминокислоты, такие как гистидин и их соли, наиболее предпочтительны цитратные или гистидиновые буферы. Предпочтительно, в конечной композиции буфер присутствует в концентрации, составляющей 1-100 мМ, предпочтительно, 1-50 мМ и, более предпочтительно, примерно 10 мМ или примерно 20 мМ.

Согласно настоящему изобретению, количества IGF-1 и GH составляют примерно 2-40 мг/мл и примерно 1-12 мг/мл, соответственно; предпочтительные количества составляют примерно 5-20 мг/мл (IGF-1) и примерно 2-8 мг/мл (hGH). Кроме того, предпочтительными являются количества, составляющие примерно 10 мг/мл (IGF-1) и примерно 3 мг/мл (hGH) или примерно 13,2 мг/мл (IGF-1) и 2 мг/мл (GH).

Отношение массы IGF-1 к массе GH, предпочтительно, находится в диапазоне от 1:1 до 9:1, или, альтернативно, в диапазоне от примерно 1:9 до 1:1. Более предпочтительным является отношение массы IGF-1 к массе GH, выбранное из следующего списка: 9:1, 6:1, 3:1, 2:1, 3:7, 1:1, 1:2, 1:5, 7:3, 9:1.

Более предпочтительные отношения массы IGF-1 к массе GH выбирают из следующих отношений: 1,1:1, 2,2:1, 3,3:1 и 6,6:1. В варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит комбинацию rhIGF-1 и rhGH в концентрациях, составляющих примерно 10-30 мг/мл и примерно 1-12 мг/мл, соответственно, с отношением массы IGF-1 к массе GH в диапазоне от примерно 9:1 до примерно 1:9, примерно 0,01-3% по массе поверхностно-активного вещества, необязательно, примерно 0,1-5% по массе консерванта, примерно 1-150 мМ буфера, предпочтительно, цитратного или гистидинового, соединение, предупреждающее агрегирование, такое как аргинин или лизин в концентрационном диапазоне от 80 до 200 мМ. Необязательно, композиция может также содержать один или два модификатора тоничности, такие как NaCl, KCl в концентрации, составляющей примерно 0-150 мМ и/или наполнители, такие как трегалоза, маннит, сорбит или сахароза, 1-10% по массе маннита, сорбита, трегалозы или сахарозы.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей комбинацию IGF-1 и GH.

Человеческий гормон роста человека и инсулиноподобный фактор роста, включаемые в фармацевтическую лекарственную форму согласно настоящему изобретению, производят, предпочтительно, рекомбинантными средствами.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения IGF-1 и GH, предпочтительно, в композиции согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту, каждый в эффективных количествах или каждый в количествах, которые являются субоптимальными, но эффективными при комбинировании. Предпочтительно, такие количества составляют примерно 25-250 мкг IGF-1 на кг массы тела в день и примерно 0,05-0,5 мг GH на кг массы тела в неделю.

Предпочтительно, фармацевтическую лекарственную форму вводят посредством инъекции; предпочтительно, инъекция является парентеральной, такой как подкожная, внутримышечная, внутривенная инъекция или инфузия; наиболее предпочтительно, фармацевтическую композицию будут применять в виде ежедневной болюсной инъекции и, предпочтительно, в виде лекарственной формы с немедленным высвобождением (IRF).

Пациент, лечение которого осуществляют, предпочтительно, является млекопитающим (в частности, человеком), но он может быть и другим животным.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение предоставляет применение композиции при изготовлении лекарственного средства для такого способа лечения заболевания, который характеризуется увеличением или регулированием количества гормона роста в плазме.

5 Конкретно, настоящее изобретение предоставляет способы и композиции для лечения дефицита гормона роста (GDH); синдрома Тернера, синдрома Прадера-Вилли (PWS); низкорослости у детей, рожденных с очень низкой массой тела (VLBW), GDH у взрослых. А также для лечения эндокринного заболевания, которое включает в себя, например, введение пациенту, страдающему от метаболического расстройства, характеризующегося
10 частичной активностью эндогенного гормона роста, или указывая количество инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) и количество гормона роста (GH), которые эффективны при сочетанной терапии для исправления метаболического нарушения у пациента. При котором пациент имеет синдром идиопатической низкорослости во взрослом возрасте (ISS), при котором пациент принимает IGF-1, вводимый один раз в
15 день, и принимает GH, вводимый один раз в день, и при котором пациент принимает IGF-1 и GH, вводимые одновременно.

Настоящее изобретение также предоставляет способы и композиции для детей, страдающих от нарушений роста, характеризующихся частичной активностью эндогенного гормона роста или его признаками. Эти аномалии роста, вызывающие
20 расстройства в детском возрасте, сохраняются и у взрослых, и такой взрослый индивид может страдать от разнообразных метаболических расстройств.

Согласно настоящему изобретению, hGH и hIGF-1 применяют в виде лекарственного средства или в виде фармацевтической композиции.

Ценным преимуществом настоящего изобретения является предоставление
25 композиций, которые можно применять, предварительно наполнив некоторую емкость, такую как шприцы, или в виде лекарственных форм, готовых для применения.

Следующие примеры служат для иллюстрирования настоящего изобретения без его ограничения.

ПРИМЕР 1

Испытания растворимости

Смеси препаратов Increlex[®] (раствор 10 мг/мл, составленный в 50 мМ ацетатном буфере при pH 5,4) и Nutropin AQ[®] (раствор 5 мг/мл, составленный в 10 мМ цитратном буфере при pH 6) готовили при объемных отношениях в диапазоне от 9:1 до 1:9. Смеси
35 показывали различные степени наличия видимого осадка непосредственно после смешивания или в пределах нескольких часов после него. Масс-спектроскопический анализ осадков, образованных в смесях препаратов Nutropin AQ[®] и Increlex[®], показал, что в осадках присутствуют оба белка. В таблице 1 собраны наблюдения и результаты, относящиеся к прозрачности совместных смесей, приготовленных из коммерческих
40 продуктов IGF-1 (Increlex[®]) и GH (Nutropin AQ[®])

Таблица 1					
Отношение (об:об)	Increlex (мл)	Nutropin AQ (мл)	Наблюдения		
			Начало (20марта08)	24 часа (21марта08)	1 неделя (27марта08)
9:1	3,6	0,4	Очень слабый свободно плавающий осадок pH=5,42	Очень слабый свободно плавающий осадок	Очень слабый свободно плавающий осадок
5:1	3,6	0,72	Слабый свободно плавающий осадок pH=5,51	Слабый свободно плавающий осадок	Слабый свободно плавающий осадок

2:1	3,6	1,8	Свободно плавающий осадок pH=5,57	Свободно плавающий осадок	Свободно плавающий осадок
1:1	2,0	2,0	Свободно плавающий осадок pH=5,64	Свободно плавающий осадок	Свободно плавающий осадок

5	1:2	1,8	3,6	Мутно, тяжелый осадок pH=5,74	Прозрачно, с желеобразной пленкой на стекле	Прозрачно, с желеобразной пленкой на стекле
	1:5	0,72	3,6	Свободно плавающий осадок pH=5,85	Тяжелый комковатый осадок	Прозрачно, с желеобразной пленкой на стекле
	1:9	0,40	3,6	Свободно плавающий осадок pH=5,94	Свободно плавающий осадок	Свободно плавающий осадок

Было подтверждено, что растворимость IGF-1 превышает 20 мг/мл во всем диапазоне pH смесей (5,4-5,9); это свидетельствует о том, что растворимость IGF-1 не является причиной наблюдаемого осадка, который не является IGF-1. Было найдено, что растворимость GH в цитратном, ацетатном или гистидиновом буферах в указанном диапазоне pH зависела от буфера. Результаты демонстрируют резкое снижение растворимости в растворах GH с ацетатным буфером при pH ниже 5,6, что может служить одной из причин наблюдаемого осаждения в растворах, приготовленных из смесей.

Однако сравнительные смеси препарата Nutropin AQ[®] с плацебо препарата Increlex[®] (не содержащим IGF-1, но остальной состав которого идентичен препарату Increlex[®]) или смеси препарата Increlex[®] с плацебо препарата Nutropin AQ[®] (не содержащим GH, но остальной состав которого идентичен препарату Nutropin AQ[®]) остаются прозрачными, указывая на то, что уменьшенная растворимость белков может быть обусловленной взаимодействием между этими двумя белками. Кроме того, препарат Increlex[®], разбавленный плацебо препарата Increlex[®] до конечной концентрации 2,5 мг/мл, можно смешивать с препаратом Nutropin AQ[®] при отношениях IGF-1:hGH, составляющих 2,2:1 или больших, без какого бы то ни было осаждения, что указывает на то, что взаимодействия между белками являются обратимыми.

ПРИМЕР 2

Сравнение и получение совместно смешанных композиций в цитратном буфере при разных pH

Лиофилизированный hGH растворяли в 10 мМ цитратном буфере при pH 6, содержащем 150 мМ хлорида натрия и 0,2% полисорбата 20, до конечной концентрации 5 мг/мл. Растворы IGF-1 в буферах разных составов, показанных в первом столбце таблицы 1, получали либо посредством диализа IGF-1 против соответствующего буфера, либо посредством растворения лиофилизованного IGF-1 в указанном буфере. Конечная концентрация растворов IGF-1 до смешивания с растворами GH составляла 10 мг/мл. Растворы GH и IGF-1 смешивали друг с другом в разных отношениях, показанных в таблице 2.

Результаты визуального обследования внешнего вида совместных смесей, приготовленных из раствора GH в цитратном буфере и растворов IGF-1 в разных буферах, собраны в таблице 2.

Таблица 2		
Препарат IGF-1	Отношение смешивания hGH:IGF-1	Внешний вид смесей после 1-2 недель при 5°C
10 мМ цитрат, pH 5,4	1:9	Прозрачный
	3:7	Прозрачный
	1:1	Некоторое количество частиц

5	20 мМ цитрат, pH 6	7:3	Частицы
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Небольшое количество частиц
		1:1	Небольшое количество частиц
10	50 мМ цитрат, pH 5,4	7:3	Небольшое количество частиц
		9:1	Небольшое количество частиц после смешивания
		1:9	Прозрачный
		3:7	Прозрачный
		1:1	Небольшое количество частиц
15	10 мМ ацетат, pH 5,4	7:3	Некоторое количество частиц
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Слегка мутный, прозрачный после смешивания
		1:1	Слегка мутный раствор
20	50 мМ ацетат, pH 5,4	7:3	Мутный раствор
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Очень небольшое количество частиц
		1:1	Частицы
25	10 мМ фосфат, pH 6	7:3	Мутная суспензия
		9:1	Мутная суспензия
		1:9	Прозрачный после смешивания
		3:7	Мутный раствор
		1:1	Мутный раствор
30	50 мМ фосфат, pH 6	7:3	Мутный раствор
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Слегка мутный, прозрачный после смешивания
		3:7	Мутный после смешивания
		1:1	Частицы
35	10 мМ гистидин, pH 5,4	7:3	Мутная суспензия
		9:1	Мутная суспензия
		1:9	Прозрачный
		3:7	Слегка мутный после смешивания
		1:1	Слегка мутный после смешивания
40	50 мМ гистидин, pH 5,4	7:3	Мутный раствор
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Преимущественно прозрачный после смешивания
		1:1	Частицы
45	10 мМ гистидин, pH 6	7:3	Мутная суспензия
		9:1	Мутная суспензия
		1:9	Прозрачный
		3:7	Прозрачный
		1:1	Слегка мутный
	50 мМ гистидин, pH 6	7:3	Слегка мутный после смешивания
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Мутный раствор
		1:1	Мутный раствор
		7:3	Мутный раствор
		9:1	Мутный раствор
		1:9	Прозрачный
		3:7	Мутный раствор
		1:1	Мутный раствор

Наблюдения, записанные в таблице 2, показывают, что растворы IGF-1 в различных буферах образуют осадки при смешивании с GH, растворенным в цитратном буфере при pH 6.

ПРИМЕР 3

Получение композиций и испытания прозрачности композиции с цитратным буфером

Растворы каждого белка (IGF-1 и hGH) с приблизительной концентрацией 19 мг/мл отдельно диализовали против 10 мМ цитратного буфера при pH 6,0, содержащего 10 мМ аргинина. После диализа, проводившегося в течение ночи, определяли концентрации растворов, измеряя поглощение в ультрафиолетовой (УФ) области при 280 нм. Конечные концентрации растворов IGF-1 и hGH составляли 14 и 21 мг/мл, соответственно. Индивидуальные аликвоты каждого раствора дополняли остальными эксципиентами, как показано в таблице 3, и разбавляли до конечной концентрации белка 10 мг/мл. Каждую пару индивидуально составленных белковых растворов (IGF-1 и hGH) смешивали в отношении 1:1, получая смеси, содержавшие по 5 мг/мл каждого белка. После получения смесей двух белков в каждый препарат индивидуального белка и в препараты совместных смесей добавляли одно из двух поверхностно-активных веществ до конечных концентраций. Растворы обследовали после выдерживания в охлажденном состоянии в течение 72 часов. Две смеси, которые в это время оставались прозрачными (препараты композиций, обозначенные в таблице 3 как A2 и A10), помещали на хранение в холодильник и через 70 дней опять обследовали для подтверждения того, что они оставались прозрачными и после этого срока хранения. В таблице 3 собраны результаты обследования внешнего вида цитратных препаратов после 72 часов при 5°C.

Таблица 3

Обозначение образца	Эксципиенты	IGF-1 (10 мг/мл)	hGH (10 мг/мл)	Совместная смесь (5 мг/мл IGF-1 + 5 мг/мл hGH)
		Прозрачность раствора после 72 часов		
A1	10 мМ аргинина, 0,2% полисорбата 20, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A2	100 мМ аргинина, 0,2% полисорбата 20, 50 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	да	да
A3	10 мМ аргинина, 0,2% полисорбата 20, 150 мМ NaCl, 0,25% Фенол, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A4	10 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A5	100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A6	10 мМ аргинина, 0,03% полоксамера 188, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A7	100 мМ аргинина, 0,03% полоксамера 188, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A8	10 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 75 мМ NaCl, 2,5% маннита, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A9	10 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 5% маннита, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	нет	нет
A10	100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 5% маннита, 1% BzOH, 10 мМ цитрата, pH 6,0	да	да	да

Оба прозрачных препарата (A2 и A10) содержали 100 мМ добавленного иона аргининия и небольшое количество добавленного хлорида натрия (или совсем не содержали хлорида натрия). Два препарата, обозначенные в Таблице 3 как A1 и A9, которые были почти идентичными композициям A2 и A10, соответственно, но содержали меньшее количество добавленного иона аргининия (10 мМ), не оставались прозрачными.

ПРИМЕР 4**Получение и сравнительное испытание прозрачности композиции с гистидиновым буфером**

Раствор IGF-1 (19 мг/мл) диализовали против 10 мМ гистидинового буфера с pH 5,6, содержащего 10 мМ аргинина. После диализа концентрация раствора, измеренная по поглощению в ультрафиолетовой (УФ) области при 280 нм, составляла 18 мг/мл. Раствор дополняли необходимыми количествами добавочного аргинина, бензилового спирта, поверхностно-активного вещества (Полисорбат 20 или Полосамер 188), хлорида натрия и маннита, для получения композиций, обозначенных в таблице 4 как В1-В8.

Аликвоты препаратов, содержащих только IGF-1, использовали для растворения лиофилизованного гормона роста, получая соответствующие препараты, содержавшие по 5 мг/мл каждого белка. Внешний вид растворов обследовали после охлаждения при 5°C в течение 24 часов. В этот момент все препараты показывали наличие некоторого количества осадка, за исключением трех препаратов, обозначенных в таблице 4 как В3, В4 и В8. Эти препараты хранили в холодильнике в течение следующих 65 дней; в конце этого времени они оставались прозрачными. В таблице 4 собраны данные о препаратах с гистидиновым буфером при pH 5,6 после 24 часов при 5°C.

Таблица 4

Обозначение образца	Экспоненты	IGF-1 (5 мг/мл)	Совместная смесь (5 мг/мл IGF-1+5 мг/мл hGH)
		Прозрачность раствора после 72 часов	
В1	10 мМ аргинина, 0,2% полисорбата 20, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидина, pH 5,6	Да	Нет
В2	10 мМ аргинина, 0,02% полисорбата 20, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидин, pH 5,6	Да	Нет
В3	100 мМ аргинина, 0,02% полисорбата 20, 50 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидин, pH 5,6	Да	Да
В4	100 мМ аргинин, 0,3% полосамер 188 20, 50 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидина, pH 5,6	Да	Да
В5	10 мМ аргинина, 0,3% полосамера 188 20, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидина, pH 5,6	Да	Нет
В6	10 мМ аргинина, 0,03% полосамера 188 20, 150 мМ NaCl, 1% BzOH, 10 мМ гистидина, pH 5,6	Да	Нет
В7	0,3% полосамер 188 20, 5% маннита, 1% BzOH, 10 мМ гистидин, pH 5,6	Да	Нет
В8	100 мМ аргинина, 0,3% полосамера 188, 5% маннита, 1% BzOH, 10 мМ гистидина, pH 5,6	Да	Да

Все три препарата смесей, остававшиеся прозрачными, содержали по 100 мМ иона аргинина. Препарат смеси, обозначенный В7, который точно соответствует композиции препарата В8 в таблице 4, но не содержащий добавленного аргинина, показал наличие осадка, наблюдавшегося после охлаждения в течение 24 часов, тогда как препарат В8 оставался прозрачным. Сходным образом, препарат смеси, обозначенный в таблице 4 как В4, оставался прозрачным и после продолжительного охлаждения, тогда как препарат В2, который содержал только 10 мМ аргинина и дополнительный хлорид натрия, прозрачным не оставался.

ПРИМЕР 5**Получение композиции с гистидиновым буфером при pH 6**

Растворы каждого белка (IGF-1 и hGH) с приблизительной концентрацией 19 мг/мл раздельно диализовали против 10 мМ гистидинового буфера при pH 6, содержащего 10 мМ аргинина. После диализа, проводившегося в течение ночи, определяли концентрации растворов, измеряя поглощение в ультрафиолетовой (УФ) области при 280 нм. Конечные концентрации растворов IGF-1 и hGH после диализа составляли 11

и 21 мг/мл, соответственно. В растворы индивидуально добавляли необходимые количества дополнительного аргинина, бензилового спирта, поверхностно-активного вещества (полисорбата 20 или полоксамера 188), хлорида натрия и маннита для

- 5 Индивидуальные препараты белков смешивали в отношении 1:1 для получения совместных смесей, и внешний вид всех 6 растворов обследовали после охлаждения при 5°C в течение 72 часов. Оба комплекта препаратов гормона роста и совместных смесей показали наличие некоторого количества осадка, причиной чего, возможно, была высокая концентрация соли (150 мМ) в этих препаратах. В таблице 5 собраны
- 10 данные о препарате с гистидиновым буфером при pH 6 после 72 часов при 5°C.

Таблица 5				
Обозначение образца	Эксципиенты	IGF-1 (10 мг/мл)	hGH (10 мг/мл)	Совместная смесь (5 мг/мл IGF-1+5 мг/мл hGH)
C1	100 mM аргинина, 0,3% полоксамера 188, 150 mM NaCl, 1% BzOH, 10 mM гистидина, pH 6,0	Да	Нет	Нет
C2	0,3% полоксамера 188, 150 mM NaCl, 1% BzOH, 10 mM гистидина, pH 6,0	Да	Нет	Нет

ПРИМЕР 6

20 Получение и сравнение композиции с цитратным и гистидиновым буфером

Два препарата были получены с каждым белком (IGF-1 и GH) с конечными концентрациями белков, составлявшими 20 мг/мл и 6 мг/мл, соответственно:

Препарат 1: 10 мМ цитрата, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 100 мМ аргинина, 50 мМ NaCl, pH 6,2

Препарат 2: 10 мМ гистидина, 100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 1% бензилового спирта, 50 мМ NaCl, pH 5,8

- 25 Препараты получали, заменяя буфер в растворе каждого белка посредством тангенциальной проточной фильтрации против каждого из двух буферов (буфер 1 и буфер 2), для получения четырех запасных растворов, концентрации которых показаны в таблице 6. В таблице 6 собраны данные о запасных растворах, приготовленных для
- 30 препаратов.

Таблица 6		
Буферная система	Концентрация белка после замены буфера (мг/мл)	
	IGF-1	GH
Буфер 1: 10 мМ цитрата, 50 мМ NaCl, 100 мМ аргинина pH 6,0	38 мг/мл	15 мг/мл
Буфер 2: 10 мМ гистидина, 50 мМ NaCl, 100 мМ аргинина pH 5,6	29 мг/мл	14 мг/мл

- 35 В каждый запасной раствор при осторожном перемешивании добавляли дополнительные запасные растворы буфера и поверхностно-активного вещества, после чего добавляли необходимое количество очищенного VzOH (бензилового спирта) для достижения конечного состава препаратов 1 и 2 с каждым белком. Концентрации белков IGF-1 и hGH в этих препаратах составляли 20 мг/мл и 6 мг/мл, соответственно. Четыре
- 40 препарата (два препарата IGF-1 и два препарата hGH) затем разбавляли и/или смешивали для получения конечных препаратов и совместных смесей, указанных в таблице 7. После этого растворы хранили при 2-8°C до времени дальнейшего разбавления и розлива по флаконам. Все белковые растворы стерильно фильтровали, используя
- 45 мембраны PES, и затем разливали аликвотами в 3-мл стеклянные флаконы. Флаконы закрывали пробками, укупоривали закатанными колпачками и хранили до 8 недель в холодильнике. Внешний вид каждого раствора оценивали с двухнедельными интервалами в течение 8 недель. В конце 8 недель все 14 растворов были все еще прозрачными и

бесцветными. В Таблице 7 собраны результаты визуального обследования внешнего вида цитратных и гистидиновых препаратов, содержащих 100 мМ аргинина.

Таблица 7					
Цитратные препараты: 10 мМ цитрата, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 100 мМ аргинина, 50 мМ NaCl, pH 6,2					
Обозначение	Отношение	hGH	IGF-1	Внешний вид раствора	
	GH:IGF-1	(мг/мл)	(мг/мл)	Непосредственно после смешивания	После 8 недель при 5°C
CA1	1:1,1	3	3,3	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CA2	1:4	2,5	10	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CA3	только GH	3	-	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CA4	только IGF-1		10	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CC1	1:1,1	4,5	5	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CC2	только GH	6	-	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
CC3	только IGF-1	-	20	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
Гистидиновые препараты: 10 мМ гистидина, 100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 1% бензилового спирта, 50 мМ NaCl, pH 5,8					
Обозначение	Отношение	hGH	IGF-1	Внешний вид раствора	
	GH:IGF-1	(мг/мл)	(мг/мл)	Непосредственно после смешивания	После 8 недель при 5°C
HB1	1:1,1	3	3,3	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HB2	1:4	2,5	10	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HB3	только GH	3	-	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HB4	только IGF-1	-	10	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HD1	1:1,1	4,5	5	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HD2	только GH	6	-	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор
HD3	только IGF-1	-	20	Прозрачный, бесцветный раствор	Прозрачный, бесцветный раствор

Химическую стабильность композиций в течение восьминедельного периода проверяли посредством периодического анализа препаратов и совместных смесей. Их хранили охлажденными при 5°C и неохлажденными при 25°C для обнаружения первичных, ограничивающих стабильность, продуктов разрушения IGF-1 (des-Gly, Pro-IGF-1) и GH (дезамидированного GH) и для сравнения их скоростей разрушения со скоростями, установленными для зарегистрированных контрольных препаратов, обладавших долговременной стабильностью, в качестве которых использовали Increlex[®] (IGF-1, жидкий для инъекций) и Nutropin AQ[®] (GH, жидкий для инъекций). Скорости разрушения представлены в таблицах 8 и 9. Препараты не показывают никакой тенденции к медленному разрушению IGF-1 при 5°C в течение 8-недельного периода; однако новые препараты и совместные смеси, хранившиеся при 25°C, показывают стабильность, сравнимую с обычными повышенными скоростями разрушения, наблюдавшимися для препарата Increlex[®]. Деамидирование GH в новых препаратах и совместных смесях показывает скорости, сравнимые с контрольным препаратом Nutropin AQ[®], как при 5°C, так и при 25°C.

Таблица 8

Препарат	hGH (мг/мл)	IGF-1 (мг/мл)	Экципиенты	Скорость разрушения (% увеличения DGP-IGF-1 за неделю) при 25°C
CA1	3	3,3	10 мМ цитрата, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 100 мМ аргинина, 50 мМ NaCl, pH 6,2	1,04E-01
CA2	2,5	10		1,05E-01
CA4		10		9,02E-02
CC1	4,5	5		8,49E-02
CC3		20		8,96E-02
HB1	3	3,3	10 мМ гистидина, 100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 1% бензилового спирта, 50 мМ NaCl, pH 5,8	8,17E-02
HB2	2,5	10		8,72E-02
HB4		10		7,31 E-02
HD1	4,5	5		7,96E-02
HD3		20		6,78E-02

Increlex*		10	50 мМ ацетата, 0,2% полисорбата 20, 0,9% бензилового спирта, 100 мМ NaCl, pH 5,4	1,19E-01
-----------	--	----	--	----------

* средняя скорость разрушения для 15 партий

Препарат	hGH (мг/мл)	IGF-1 (мг/мл)	Экципиенты	Скорость дезамидирования (% увеличения за неделю)	
				при 5°C	при 25°C
CA1	3	3,3	10 мМ цитрата, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 100 мМ аргинина, 50 мМ NaCl, pH 6,2	1,91 E-02	2,85E-01
CA2	2,5	10		2,09E-02	3,25E-01
CA3	3			1,56E-02	2,71 E-01
CC1	4,5	5		2,48E-02	3,04E-01
CC2	6			2,36E-02	3,00E-01
HB1	3	3,3	10 мМ гистидина, 100 мМ аргинина, 0,3% полоксамера 188, 1% бензилового спирта, 50 мМ NaCl, pH 5,8	1,53E-02	1,33E-01
HB2	2,5	10		2,01 E-02	1,62E-01
HB3	3			1,43E-02	1,22E-01
HD1	4,5	5		1,66E-02	1,51 E-01
HD2	6			1,99E-02	1,44E-01
Nutropin AQ	5		10 мМ цитрата, 0,2% полисорбата 20, 0,25% фенола, 150 мМ NaCl, pH 6,0	2,12E-02	2,99E-01

ПРИМЕР 7**Получение и сравнение композиций IGF-1 с гистидиновым буфером**

Два препарата были приготовлены с IGF-1 при конечных концентрациях белка 20 мг/мл (IGF-1):

Препарат 1: 20 мМ гистидина, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 150 мМ аргинина, pH 5,8

Препарат 2: 50 мМ гистидина, 0,2% полисорбата 20, 1% бензилового спирта, 150 мМ аргинина, pH 5,8

Препараты готовили, проводя для каждого белка замену буфера двумя другими буферами, составленными с добавлением поверхностно-активного вещества и консерванта; оценку стабильности осуществляли вместе с контрольными препаратами Increlex®. Данные о стабильности при 5°C, 25°C и 40°C представлены в таблице 10.

Таблица 10				
Пик/Группа	Образец	Скорость деградации (дни ⁻¹)		
		5°C	25°C	40°C
% активный 1	Препарат с 50 мМ гистидина	1,43E-02	4,00E-02	1,30E-01
	Контроль Increlex	1,86E-02	3,71 E-02	1,43E-01
% главный пик	Препарат с 50 мМ гистидина	-2,14E-02	-5,90E-02	-2,43E-01
	Контроль Increlex	-2,90E-03	-3,29E-02	-2,10E-01

% активный 1	Препарат с 20 мМ гистидина	1,72E-04	1,87E-02	1,46E-01
	Контроль Increlex	2,67E-03	1,66E-02	1,39E-01
% главный пик	Препарат с 20 мМ гистидина	-1,36E-02	-5,87E-02	-3,03E-01
	Контроль Increlex	4,39E-03	-1,75E-02	-2,12E-01

ПРИМЕР 8

Данные о стабильности комбинированных препаратов

Таблица 11															
Темп.	Число месяцев	Дата испытания или окончания срока годности ¹	Реальное число месяцев	Increlex (% мономера)		Только rhIGF-1 (% мономера)		Nutropin (% мономера)		Только rhIGF (% мономера)		Совместный препарат 1:2,2 (% мономеров)		Совместный препарат 1:6,6 (% мономеров)	
				IGF-1	GH	IGF-1	GH	IGF-1	GH	IGF-1	GH	IGF-1	GH	IGF-1	GH
-	0	22 окт. 09	0,000	99,5	--	99,7	--	--	99,9	--	100,0	99,5	100,0	99,6	100,0
5°C	3	27 янв. 10	3,189	99,3	--	99,5	--	--	99,6	--	99,9	99,5	100,0	99,6	100,0
	6	03 мая 10	6,345	99,9	--	99,9	--	--	99,5	--	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
15°C	1	18 нояб. 09	0,888	99,6	--	NT	NT	--	99,5	NT	NT	99,4	100,0	99,5	100,0
	3	18 янв. 10	2,893	99,4	--	NT	NT	--	99,4	--	99,8	99,4	99,9	99,4	100,0
25°C	6	16 апр. 10	5,786	99,9	--	NT	NT	--	99,1	--	99,9	100,0	100,0	100,0	100,0
	1	18 нояб. 09	0,888	99,5	--	99,5	--	--	99,7	NT	NT	99,2	100,0	99,3	100,0
	3	18 янв. 10	2,893	98,9	--	98,8	--	--	98,5	--	98,8	99,0	99,4	99,2	100,0
	6	16 апр. 10	5,786	99,2	--	98,4	--	--	99,7	NT	NT	97,9	98,0	98,6	98,9
40°C	1	18 нояб. 09	0,888	97,7	--	95,0	--	--	98,0	--		98,0	93,3	97,6	94,5
	3	18 янв. 10	2,893	92,3	--	83,2	--	--	91,9	--		94,3	92,9	93,9	88,3

¹поскольку образцы хранили при 5°C до времени проведения испытаний, для большей точности дату проведения теста использовали для расчета тренда при 5°C, а дату завершения срока годности использовали для расчета тренда по данным ускоренной стабильности (для большей точности).
NT - образец не испытывали

Эти данные были получены посредством гелепроникающей хроматографии; они дают представление о стабильности в течение 1, 3 и 6 месяцев.

ПРИМЕР 9

Установление альтернативного способа приготовления совместных препаратов rhIGF-1 и rhGH

1. Материалы и методика

1.1. Сырьевые материалы

В исследовании использовали сырьевые материалы, указанные в таблице 12.

Таблица 12 Сырьевые материалы		
	Материал	Поставщик
5	rhGH	Genentech
	rhIGF-1	Lonza
	Лимонная кислота	Sigma
	Аргинин-HCl	Merck
	Фенол	Merck
10	Полоксамер 188	BASF
	Сахароза	Beghin Say
	Гидроксид натрия	Merck
	WFI	Cooper
	Флаконы на 5 мл VB type Iyo	Schott
10	Крышки 13 мм	West - CTSU
	Алюминиевые колпачки 13 мм	West

1.2. Оборудование

В исследовании использовали следующее оборудование:

- Автоклав FEDEGARI,
- Стерильные полиэтиленовые (PE) бутылки Nalgene ref. 2019,
- Кассеты для диафильтрации BIOMAX PES ref.: PXB005A50,
- «Чистая комната», ламинарный бокс,
- оборудование для тангенциальной проточной фильтрации Cogent μ Scale MILLIPORE,
- Фильтры MILLEX (33 мм) PES 0,22 мкм (MILLIPORE),
- Фильтры MILLEX (33 мм) PVDF 0,22 мкм (MILLIPORE), стеклянные стаканы,
- Мерные цилиндры, магнитные мешалки,
- Микропипетки P1000,
- Сушильный шкаф FEDEGARI,
- Оборудование для обследования флаконов, соответствующее фармакопее,
- Насос FLEXICON PF6 n°212118,
- Шприц PE 50 мл,
- Пробирки Eppendorf 1,5 мл,
- Пробирки Falcon 50 мл и 15 мл,
- Трубки Tygon (1,6 мм + соответствующая игла),
- Моечная машина CORIMA.

2. Способ и формула оптимизации композиции

Проводили испытания способа и оптимизации препарата. Композиции препарата были такими, как описано ниже в таблице 13:

Таблица 13 Композиция прототипных препаратов А3-с			
	Отношение	2,2:1	2,2:1
	Наименование	А3	А3-с
40	Стратегия способа	А	А
	rhIGF-1 [мг/мл]	7,9	7,9
	rhGH [мг/мл]	3,6	3,6
	pH	6,0	6,0
	Наполнитель [мМ]	Сахароза 200	Сахароза 140
45	Аргинин HCl [мМ]	150	150
	Гистидин [мМ]	-	-
	Цитрат [мМ]	20	20
	Сукцинат [мМ]	-	-
	Полоксамер 188 [мг/мл]	2	2
	Полисорбат 20 [мг/мл]	-	-
	Бензиловый спирт [мг/мл]	-	-

Фенол [мг/мл]	3,7	3,7
Антиоксидант [мМ]	-	-

2.1. Способ тангенциальной проточной фильтрации rhIGF-1 (TFF)

Способ TFF применяли для rhIGF-1, используя следующие параметры:

- использованное количество IGF-1:

80 мл rhIGF-1 с концентрацией 25 мг/мл,

- концентрация диафильтрации - 25 мг/мл,

- заменяющий буфер: 20 мМ цитрата, 150 мМ аргинина, pH 6,0,

- кассета Pellicon XL: мембрана из регенерированной целлюлозы с пределом эксклюзии

5 кДа,

- TMP 18-22 атм,

- насос установлен на 12% емкости,

- 6 диализных объемов,

- конечная концентрация rhIGF-1 - 30 мг/мл.

2.2. Составление препаратов белков:

1. В этом альтернативном способе сначала смешивали вместе все эксципиенты, а затем к эксципиентам добавляли белок.

2. Раствор эксципиентов готовили при pH ниже 6,0, так чтобы добавление лекарственной субстанции (drug substance, DS) гормона роста (GH) (при pH около 7,5-

8) заканчивалось бы получением раствора при pH ниже 7.

2.2.1. Препарат IGF-1

1. Отвешивали 8,44% конечного объема 80 мМ цитрат-аргинин 600 pH 5,5 в стеклянном стакане.

2. Добавляли 10% конечного объема 3,7%-ного фенола.

3. Добавляли 10% конечного объема 2%-ного полоксамера 188.

4. Перемешивали до гомогенизации.

5. Добавляли 3,84 г сахарозы.

6. Перемешивали до растворения и гомогенизации.

7. Измеряли значение pH: 5,86.

8. При осторожном перемешивании раствора добавляли диафильтрованный rhIGF-1 в объеме, соответствующем 1,6 г. Объем рассчитывали следующим образом:

9. 52,7 (мл) (объем диафильтрованного IGF-1)=1600 [мг] (необходимое количество rhIGF-1)/30,36 [мг/мл] (концентрация IGF-1)

10. Перемешивали до гомогенизации.

11. Измеряли значение pH: 6,05, поэтому не проводили никакой коррекции pH.

12. Доводили до конечного объема 80 мл водой для инъекций.

13. Измеряли значение pH: 6,05.

14. Фильтрация через 0,22-мкм PES-фильтры.

15. Фильтрация через 0,22-мкм PVDF-фильтры.

2.2.2. Препарат GH

1. Добавляли 25% конечного объема 80 мМ цитрат/аргинин 600 pH 5,5 в стеклянном стакане.

2. Добавляли 10% конечного объема 3,7%-ного фенола.

3. Добавляли 10% конечного объема 2%-ного полоксамера 188.

4. Добавляли 10% конечного объема воды для инъекций.

5. Перемешивали до гомогенизации.

а. Прозрачный раствор с небольшим количеством частиц (по-видимому, попадавших из окружающей среды).

б. Измеряли значение pH: 5,9.

6. Добавляли 4,83 г сахарозы.

7. Перемешивали до растворения и гомогенизации.

а. pH 5,87;

5 8. Добавляли 30 мл лекарственной субстанции GH, осторожно перемешивая раствор.

9. Перемешивали до гомогенизации

а. Измеряли значение pH: 6,6.

б. Конечный pH 6,0.

10. Фильтрация через 0,22-мкм PES-фильтры.

10 11. Фильтрация через 0,22-мкм PVDF-фильтры.

2.2.3 Совместный препарат (или совместная смесь)

Для получения 45 мл конечной совместной смеси rhIGF-1/rhGH (2,2:1):

1. Добавляли 17,9 мл препарата IGF-1 к 27,1 мл rhGH, перемешивая магнитной мешалкой.

15 2. Перемешивали до гомогенизации.

3. Раствор имел прозрачный внешний вид без видимых частиц.

4. Фильтрация через 0,22-мкм PES-фильтры в «чистой комнате» здания 2: получен прозрачный раствор без видимых частиц, легко отбираемый и переносимый шприцем.

20 3. Применение альтернативного способа к отобранному препарату с использованием гистидина в качестве буфера

3.1. Осуществимость приготовления препарата

Препарат можно получать так, как описано в §2.2.1 для препарата rhIGF-1, в §2.2.2 для препарата rhGH и в §2.2.3 для совместных препаратов (2.2.1 для совместной смеси) со следующими изменениями:

25 - гистидин вместо цитрата в качестве буферного средства,

- pH 6,0 вместо 5,8,

- полисорбат-20 вместо полоксамера-188 в качестве поверхностно-активного вещества,

- чистый бензиловый спирт вместо 10%-ного раствора фенола в качестве консерванта,

30 - 2,5%-ный раствор HCl вместо 2,5%-ного раствора лимонной кислоты для корректировки pH,

- PVDF-фильтры для фильтрации индивидуальных белковых продуктов и препарата совместной смеси,

- получали совместные препараты с отношениями 1,1:1 и 6,6:1 вместо совместного

35 препарата смеси с отношением 2,2:1.

3.2 Оптимизация воспроизводимости фильтрации

Способ проводили так, как было описано в §3.1 (в лаборатории при 21°C), с тем исключением, что процесс фильтрации проводили согласно последовательности действий, описанной ниже:

40 - 150 мл препарата rhGH подвергали первому осветляющему фильтрованию через 0,22-мкм PES-фильтры, после которого проводили второе стерилизующее фильтрование через PVDF-фильтры.

- 150 мл препарата rhGH подвергали первому осветляющему фильтрованию через 0,22-мкм PVDF-фильтры, после которого проводили второе стерилизующее

45 фильтрование через PVDF-фильтры.

Наблюдали следующие факты:

- Раствор rhGH до осветляющего фильтрования имел слегка опалесцирующий внешний вид и не имел осадков.

- После обеих серий фильтрования препараты rhGH выглядели свободными от частиц.
 - Анализы, проведенные посредством визуального обследования, подтверждали положительный эффект от применения PVDF-фильтров для конечного стерилизующего фильтрования препаратов и совместных препаратов, т.е. применение фильтров этого типа значительно уменьшало количество видимых частиц и обеспечивало хорошую стабильность.

Таблица 14

Композиции препарата и совместного препарата

		Композиции			
		Индивидуальный препарат GH	Индивидуальный препарат IGF-1	Совместный препарат с отношением IGF-1/GH, равным 1,1:1	Совместный препарат с отношением IGF-1/GH, равным 6,6:1
pH		5,8			
Буфер	Гистидин	20 мМ			
	Бикарбонат Na	7,5 мМ	-	5,6 мМ	2,5 мМ
Поверхностно-активное вещество	Полисорбат 20	0,2%			
Консервант	Бензиловый спирт	1%			
Стабилизатор	Аргинин	150 мМ			
		6 мг/мл	20 мг/мл	5:4,5 (мг/мг)/мл	13,2:2 (мг/мг)/мл

ПРИМЕР 10**Способы получения совместных препаратов rhIGF-1 и rhGH**

Нерасфасованный материал rhGH (субстанция лекарственного вещества, или DS) представляет собой его раствор с концентрацией 20 мг/мл в 7,5 мМ бикарбонатном буфере. Нерасфасованный материал rhIGF-1 (DS) представляет собой его раствор с концентрацией 25-35 мг/мл в 200 мМ цитратном буфере.

Три разных способа были разработаны следующим образом (в дальнейшем тексте они обозначены как способ I и альтернативные способы A и B):

Стадии способа I:

- диафильтрация rhGH и rhIGF-1 для замены оригинального буфера DS буфером с 20 мМ гистидина (His) и 150 мМ аргинина (Arg) pH 5,8,
- для каждого индивидуального белка смешивание проводили, вводя компоненты в следующем порядке:
 - добавление заменяющего буфера для доведения концентрации DS до нужного значения,
 - добавление раствора полисорбата PS 20,
 - добавление раствора бензилового спирта (BA),
 - совместное перемешивание индивидуальных препаратов для производства стабильного совместного препарата.

Стадии процесса A:

- диафильтрация rhGH и rhIGF-1 для замены оригинального буфера DS буфером с 20 мМ гистидина (His) и 150 мМ аргинина (Arg) pH 5,8,
- конечное смешивание для каждого белка, проводимое при следующем порядке введения компонентов:
 - концентрированный буфер,
 - раствор поверхностно-активного вещества,
 - раствор консерванта,
 - вода для инъекций,
 - наполнитель (если его применяют),

- лекарственное вещество, подвергнутое диафильтрации,
- коррекция pH лимонной кислотой (или HCl),
- вода для инъекций до конечного объема,
- совместное перемешивание индивидуальных препаратов для производства

5 стабильного совместного препарата.

Стадии способа В:

- диафильтрация rhIGF-1 для замены оригинального буфера DS буфером с 20 mM гистидина (His) и 150 mM аргинина (Arg) pH 5,8,

10 - прямой ввод нерасфасованного rhGH в препарат вместо диафильтрации нерасфасованного rhGH (т.е. добавление DS rhGH к смеси эксципиентов без замены буфера),

- конечное смешивание, проводимое в том же порядке введения компонентов, что и в способе А,

15 - совместное перемешивание индивидуальных препаратов для производства стабильного совместного препарата.

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, содержащая IGF-1 и GH и

20 - средство, предупреждающее агрегирование;

- буфер;

- неионное поверхностно-активное вещество;

- необязательно, консервант; и

- необязательно, модификатор тоничности или наполнитель,

25 где средством, предупреждающим агрегирование, является аргинин, который присутствует в концентрации, составляющей примерно 80 mM-200 mM,

буфер выбран из гистидина или цитрата в концентрации, составляющей примерно 1-50 mM,

модификатором тоничности является хлорид натрия в концентрации, составляющей примерно 1-50 mM.

30 2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где средство, предупреждающее агрегирование, представляет собой аргинин в концентрации, составляющей примерно 100-150 mM.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где буфер выбран из гистидина или цитрата в концентрации примерно 10-20 mM.

35 4. Фармацевтическая композиция по п. 1, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 в концентрации, составляющей примерно 0,1-0,3% по массе, предпочтительно, примерно 0,2% по массе.

40 5. Фармацевтическая композиция по п. 1, где неионное поверхностно-активное вещество представляет собой полоксамер 188 в концентрации, составляющей примерно 0,1-0,5% по массе, предпочтительно, примерно 0,3%.

6. Фармацевтическая композиция по п. 1, где наполнитель представляет собой маннит и/или сахарозу.

7. Фармацевтическая композиция по п. 1, где консервант представляет собой бензиловый спирт или фенол.

45 8. Фармацевтическая композиция по п. 7, где указанный консервант представляет собой бензиловый спирт в концентрации примерно 0,2-2% по массе, предпочтительно, примерно 1%.

9. Фармацевтическая композиция по п. 1, где отношение массы IGF-1 к массе GH

находится в диапазоне от примерно 1:1 до 1:9 (мас./мас.).

10. Фармацевтическая композиция по п. 1, где отношение массы IGF-1 к массе GH находится в диапазоне от примерно 1:1 до 7:1 мас./мас. и составляет, предпочтительно, 1,1:1 мас./мас., 2,2:1 мас./мас., 3,3:1 мас./мас. или 6,6:1 мас./мас.

11. Фармацевтическая композиция по п. 1, где значение pH фармацевтической композиции находится в диапазоне от примерно 5,0 до примерно 6,5, предпочтительно, от примерно 5,4 до примерно 6,2 и, более предпочтительно, от примерно 5,8 до примерно 6,2.

12. Фармацевтическая композиция по п. 1, представляющая собой лекарственную форму, готовую для применения в предварительно наполненном шприце или в картридже, предназначенном для применения в инъекторном устройстве.

13. Способ получения фармацевтической композиции по п. 1, включающий:

а) приготовление раствора hGH в буфере при pH 5-6,5, содержащем средство, предупреждающее агрегирование, и модификатор тоничности или наполнитель;

б) приготовление раствора IGF-1 посредством диализа препарата IGF-1 против буфера, применяемого на стадии (а), содержащего указанное средство, предупреждающее агрегирование, и указанный модификатор тоничности;

с) добавление поверхностно-активного вещества и, необязательно, консерванта к обоим запасным растворам; и

д) совместное перемешивание растворов hGH и IGF-1.

14. Способ получения фармацевтической композиции по п. 1, включающий:

а) приготовление раствора I посредством смешивания буфера, средства, предупреждающего агрегирование, поверхностно-активного вещества, необязательно, консерванта и, необязательно, доведения водой до нужного объема, причем раствор I имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения pH;

б) приготовление раствора IGF-1, содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, которые применяют на стадии (а), для получения раствора II;

с) добавление раствора II к раствору I для получения раствора III;

д) приготовление раствора IV посредством смешивания буфера, средства, предупреждающего агрегирование, поверхностно-активного вещества, необязательно, консерванта, и, необязательно, доведения водой до нужного объема, причем раствор IV имеет значение pH, равное примерно 5,8, или его доводят до этого значения pH;

е) приготовление раствора GH, содержащего буфер и средство, предупреждающее агрегирование, которые применяют на стадии (д), причем GH, необязательно, содержит натрий-бикарбонатный буфер для получения раствора V;

ф) добавление раствора V к раствору IV для получения раствора VI;

г) необязательно, проводимое независимо фильтрование растворов III и VI;

h) смешивание профильтрованных растворов III и VI при отношении массы IGF-1 к массе GH, составляющем примерно от 1:1 до 7:1 мас./мас., предпочтительно, 1,1:1 мас./мас., 3,3:1 мас./мас. и 6,6:1 мас./мас., для получения раствора VII; и

и) необязательно, фильтрование раствора VII.

15. Способ по п. 14, где жидкую лекарственную субстанцию GH непосредственно смешивают с раствором IV без проведения стадии (е).

16. Способ по п. 14, где лекарственная субстанция GH содержит натрий-бикарбонатный буфер.

17. Способ по любому одному из пп. 14-16, где стадии фильтрования проводят с фильтрами, изготовленными из PVDF (поливинилиденфторида).

18. Способ по любому одному из пп. 14-16, где средство, предупреждающее

агрегирование, представляет собой аргинин в концентрации, составляющей примерно 100-150 мМ.

5

10

15

20

25

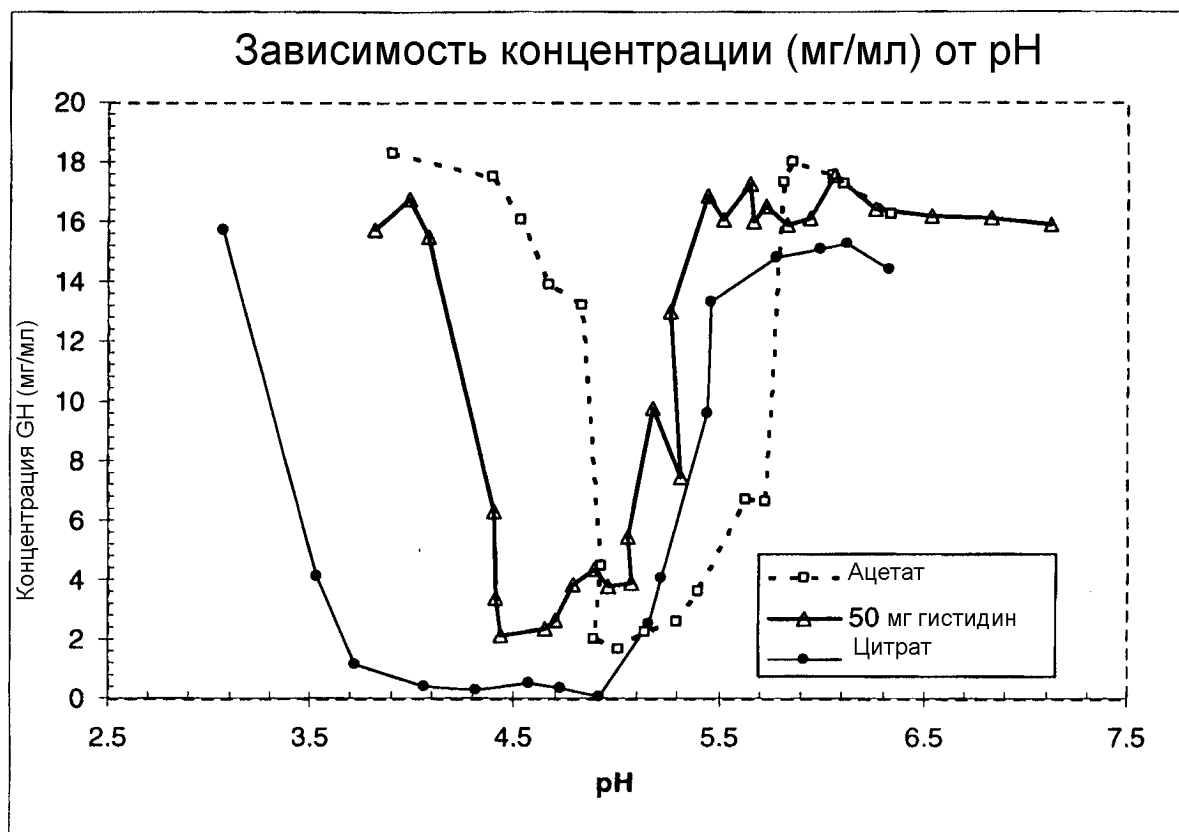
30

35

40

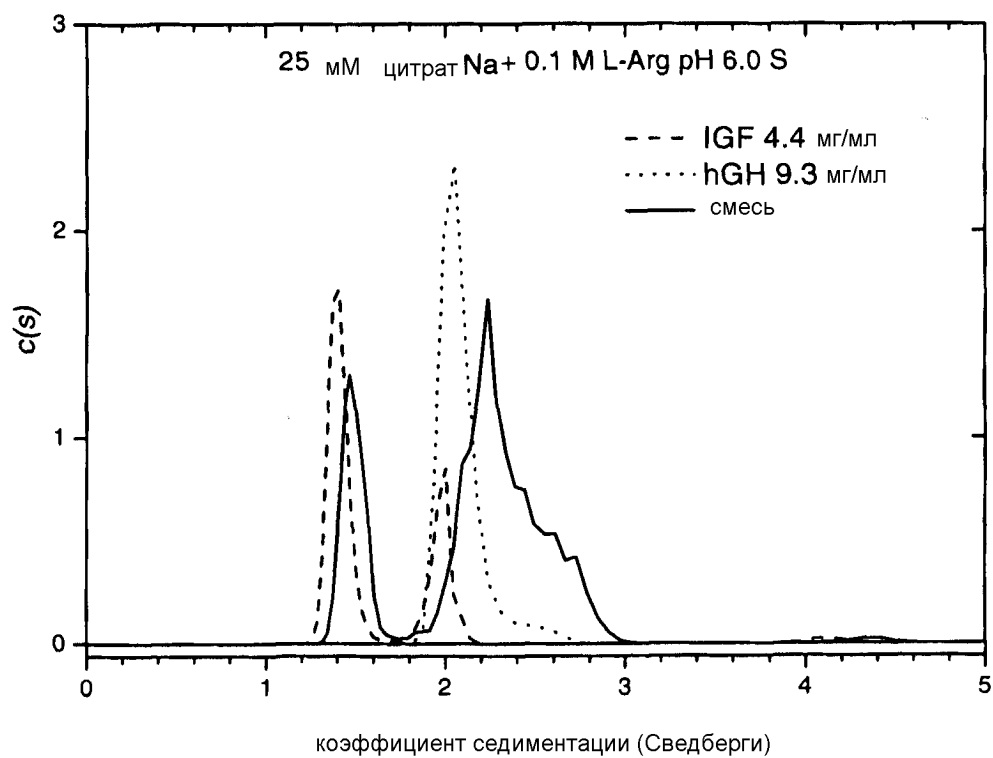
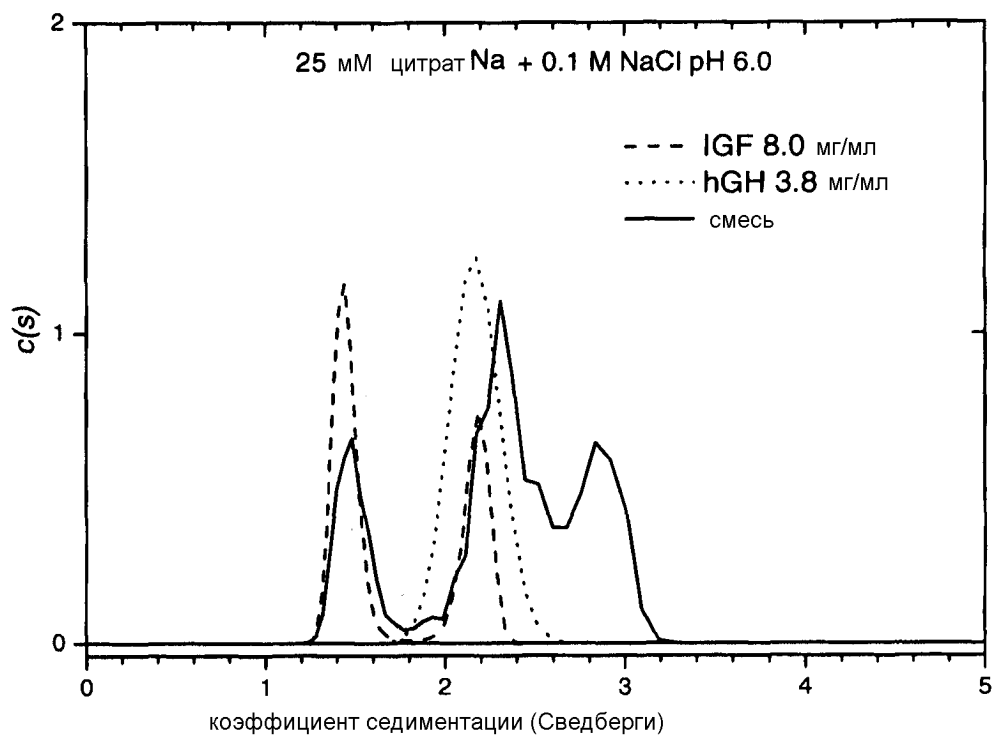
45

Профили растворимости ГН



ФИГ.1

Аналитическое ультрацентрифугирование - сравнение седиментационных профилей



ФИГ.2