

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044682**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.22

(21) Номер заявки
202191544

(22) Дата подачи заявки
2021.06.07

(51) Int. Cl. **A61K 38/19** (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ РОМИПЛОСТИМ

(43) **2022.12.30**

(96) **2021000059 (RU) 2021.06.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ГЕРОФАРМ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Драй Роман Васильевич, Шитикова
Виктория Олеговна, Филиппова
Наталья Игоревна (RU)**

(56) Инструкция по медицинскому применению препарата ЭНПЛЕЙТ (NPLATE) номер ЛСР-007739/09 2009-10-01. Государственный реестр лекарственных средств [онлайн] [найдено 2021-11-10]. [найдено в <https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=485bf5b8-2b86-4a38-92a2-6a7fccb57655&t=> Разделы "Состав", "Описание" WO-A1-2019055357 US-A1-20200069799 RU-C2-2710542 WO2020242419 БЛЫНСКАЯ Е.В. и др. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов. РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ, 2017, том 16, № 1, с. 6-1 [онлайн] [найдено 2021.11.10]. Найдено в <<https://cyberleninka.ru/article/n/tehnologicheskie-podhody-k-sovershenstvovaniyuprotsessa-liofilizatsii-belkovyh-i-peptidnyh-lekarstvennyh-preparatov/viewer>> с. 7, рис. 1

WO-A2-2009073569

(57) Изобретение относится к лиофилизированным фармацевтическим композициям терапевтического пептидного антитела ромиплостима и способу их получения. Композиции согласно изобретению содержат ромиплостим, гистидиновый буфер, маннитол, трегалозу, полоксамер 188 и имеют рН 4,0-6,0. Предлагаемые в изобретении композиции физико-химически стабильны при различных условиях хранения.

B1

044682

044682

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к улучшенным лиофилизированным фармацевтическим композициям, содержащим ромиплостим, буфер, наполнитель, стабилизатор и поверхностно-активное вещество и способу их получения. Предлагаемые композиции могут найти применение в производстве лекарственного препарата, относящегося к агонистам рецептора тромбозтина, используемого для лечения тромбоцитопении.

Уровень техники

Тромбозтин (ТПО) - цитокин, участвующий в регуляции синтеза тромбоцитов (тромбоцитопоэза) посредством активации роста и дифференцировки мегакариоцитов, клеток-предшественников тромбоцитов, в костном мозге.

ТПО синтезируется в виде белка-предшественника длиной 353 аминокислоты. Большая часть ТПО формируется в печени, при этом скорость синтеза поддерживается на одном уровне. В результате процессинга формируется зрелый белок, состоящий из двух доменов: рецептор-связывающего и высоко гликозилированного С-концевого [1].

Содержание ТПО в крови в норме обратно пропорционально количеству тромбоцитов. Механизм обратной связи реализуется путем рецептор-опосредованного разрушения цитокина при связывании с тромбозтиновыми рецепторами (CD110 или c-Mpl), которые в большом количестве представлены на поверхности тромбоцитов. При развитии тромбоцитопении общее количество рецепторов снижается, поэтому также уменьшается и рецептор-опосредованное разрушение.

Ромиплостим является агонистом тромбозтиновых рецепторов. По своей структуре он представляет Fc-конъюгированный пептид (пептидное антитело), который, как и ТПО, индуцирует тромбоцитопоэз. Молекула пептидного антитела состоит из Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина IgG1, в которой каждая одноцепочечная субъединица Fc-фрагмента на С-конце соединена ковалентной связью с пептидом-агонистом CD110, содержащим два рецептор-связывающих домена. Ромиплостим получают путем рекомбинантной ДНК-технологии с использованием штамма-продуцента *Escherichia coli* (*E.coli*). Аминокислотная последовательность ромиплостима не гомологична аминокислотной последовательности эндогенного ТПО. В доклинических и клинических исследованиях не обнаружили формирования перекрестно реагирующих антител к ромиплостиму и эндогенному ТПО [2, 3].

Ромиплостим показан для лечения хронической идиопатической (иммунной) тромбоцитопенической пурпуры у взрослых пациентов после спленэктомии, резистентной к другим видам лечения (например, глюкокортикостероидам, иммуноглобулинам). Препарат может применяться в качестве терапии второй линии у пациентов, которым противопоказана спленэктомия [2].

Как правило, пептиды в водной среде физически и химически не стабильны, что может привести к потере их биологической активности при производстве и хранении. Результатом физической нестабильности пептида может являться денатурация, агрегация, осаждение или адсорбция. Химические изменения происходят вследствие окисления, дезамидирования, протеолиза и др. Все эти процессы представляют серьезную проблему для терапевтически активных пептидов, дозировка которых зависит от биологической активности [4, 5].

Для решения проблемы физико-химической нестабильности терапевтических пептидов в водных композициях широко применяется лиофилизация (сублимационная сушка) [5, 6]. Сублимационная сушка основана на удалении влаги из замороженного материала путем возгонки (сублимации) льда, который превращается в пар, минуя жидкую фазу. Практическая реализация метода включает три этапа: замораживание, основную сушку (сублимацию льда) и досушивание (удаление остаточной влаги при температуре выше 0°C).

При разработке лекарственных препаратов, содержащих пептиды или белки в виде лиофилизатов, учитывают свойства как действующих, так и введенных вспомогательных веществ, которые должны обеспечивать эффективность лекарственного препарата, его химическую и физическую стабильность. При этом вопрос о составе препарата и концентрации веществ решается для каждого терапевтически активного пептида индивидуально, с проведением физико-химических, технологических и биофармацевтических исследований созданных композиций. Определение оптимального соотношения между основным и вспомогательными веществами является необходимым условием получения качественного лекарственного препарата.

Леофилизированные препараты терапевтически пептидных антител обычно содержат буфер, наполнитель, стабилизатор. В том случае, если во время стадии лиофилизации или на стадии восстановления происходит агрегация, в состав композиции дополнительно включают поверхностно-активное вещество (ПАВ).

В патенте EA17085 описаны лиофилизированные композиции терапевтических пептидных антител, в том числе ромиплостима, содержащие буфер, наполнитель, стабилизирующий агент и, необязательно, ПАВ. В патенте EA22424 защищено выделенное из патента EA17085 изобретение, являющееся наиболее близким аналогом настоящего изобретения - стабильная композиция ромиплостима (Fc-TMP), соответствующая составу/технологии получения оригинального препарата "Энплейт", содержащая ромиплостим в концентрации 0,5 мг/мл, 10 мМ гистидиновый буфер (pH 5), 4% вес./об., маннитола в качестве наполни-

теля, 2% вес./об., сахарозы в качестве стабилизатора и 0,004% вес./об., полисорбата-20 в качестве ПАВ. Указанные концентрации представляют собой концентрации в жидкой композиции до лиофилизации, которые равны концентрациям в восстановленном в соответствии с инструкцией по медицинскому применению лиофилизате [2]. Проведенное нами исследование стабильности оригинального препарата показало, что при хранении лиофилизата возможно появление примесей окисления, дезамидирования, протеолиза ромиплостима. Наличие таких примесей нежелательно в связи с возможным влиянием на биологическую активность препарата. Стабильность ромиплостима в композициях согласно описанию изобретения понижается по мере уменьшения концентрации белка в растворе до лиофилизации. Так, например, возможно повышение скорости агрегации и окисления при концентрациях менее 0,5 мг/мл.

В заявке WO2015150968 описаны лиофилизированные фармацевтические композиции, содержащие ромиплостим в концентрации 0,5 мг/мл, буфер, выбранный из цитратного, фосфатного, аланинового, глицинового, аргининового или их комбинации, полисорбат-20 в качестве суфракта и наполнитель, выбранный из сахарозы, трегалозы или их комбинации. Описанные в заявке лиофилизированные композиции имеют стабильность (хранение в закрытых флаконах, 15 дней или 21 день при 40°C), сопоставимую со стабильностью композиции, воспроизводящей состав оригинального препарата. Однако в заявке нет данных по изучению стабильности при долгосрочном хранении (2-8°C) и при ускоренном хранении ((25±2)°C; (60±5)%).

Общим недостатком известных лиофилизированных композиций ромиплостима является использование в них в качестве ПАВ полисорбата-20 (полиоксиэтилена (20) сорбитана монолаурата), который является химически нестабильным соединением.

Полисорбаты содержат сложноэфирные связи, а также ненасыщенные алкильные и полиоксиэтиленовые цепи, которые легко гидролизуются и самоокисляются в водной среде, что приводит к накоплению высокорекреакционных пероксидов и альдегидов. Образовавшиеся пероксиды способны окислять метиониновые и триптофановые остатки полипептида. Альдегиды реагируют с первичными аминогруппами полипептида, что может способствовать повышению иммуногенности [5, 7-10]. Лауриновая кислота, образующаяся в результате гидролиза полисорбата-20, может понижать кислотность растворов. При фильтрации растворов полипептидов полисорбат-20 может сорбироваться на фильтрующих мембранах [11].

Следовательно, существует потребность в разработке лиофилизированного фармацевтического препарата ромиплостима, не содержащего полисорбаты в качестве ПАВ, физически и химически стабильного при различных условиях хранения.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является получение новых стабильных лиофилизированных композиций ромиплостима. Поставленная цель достигается выбором концентрации активной субстанции в растворе для лиофилизации, выбором качественного и количественного состава вспомогательных веществ, условий лиофилизации.

Композиции согласно изобретению содержат ромиплостим в концентрации от 0,1 до 1,0 мг/мл, гистидиновый буфер в концентрации от 5 до 25 мМ (рН композиций 4-6), маннитол в концентрации от 3 до 4,5% мас./об., трегалозу в концентрации от 1,5 до 3% мас./об., полоксамер 188 в концентрации от 0,004 до 1% мас./об., где концентрация маннитола и трегалозы находится в соотношении от 1:1 до 3:1.

Функциональное назначение вспомогательных веществ: гистидин - буферный агент, маннитол - наполнитель, осмотический агент, трегалоза - стабилизатор, осмотический агент, полоксамер 188 - поверхностно-активное вещество. Разбавленная хлористоводородная кислота используется в случае необходимости для корректировки рН композиций до значений 4,0-6,0, предпочтительно 5,0.

Технический результат, достигаемый с использованием предлагаемых композиций, состоит в повышении их стабильности по сравнению с композицией, воспроизводящей состав оригинального препарата.

Стабильность композиций, а именно склонность к образованию родственных примесей, определяли методами: обращенно-фазовой ВЭЖХ (RP-HPLC), катионнообменной ВЭЖХ (СЕХ-HPLC), эксклюзионной ВЭЖХ (SE-HPLC) [12-14].

Метод SE-HPLC основан на разделении полипептидов по размеру, позволяет определить примеси агрегации ромиплостима (димеры, тримеры и др.). Агрегация терапевтических белков влияет на их эффективность и может вызвать иммуногенность. Согласно требованиям Международной конференции по гармонизации ICH (Q6B), агрегаты должны быть отделены от основного продукта и количественно охарактеризованы [14].

Метод СЕХ-HPLC основан на разделении полипептидов по суммарному заряду, позволяет выявить примеси дезамидирования и окисления метионина в ромиплостиме.

Метод RP-HPLC основан на разделении полипептидов с различной гидрофобностью, позволяет выделить дезамидированные и усеченные с N-конца формы ромиплостима.

С целью установления влияния концентрации гистидинового буфера в композициях на их стабильность были приготовлены композиции 1-4 (табл. 1). Состав композиции 1 (контроль) воспроизводит состав композиции оригинального препарата до лиофилизации. Концентрация гистидинового буфера в нем

10 мМ. Качественный и количественный состав композиций 2-4 аналогичен составу композиции 1 за исключением молярной концентрации гистидинового буфера, которая варьирует от 5 до 25 мМ.

Таблица 1

Качественный и количественный состав композиций 1-4

Номер композиции	1	2	3	4
Ромиплостим	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл
L-гистидин	10 мМ	5 мМ	15 мМ	25 мМ
Маннитол	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.
Сахароза	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.
Полисорбат-20	0,004 % масс./об.	0,004 % масс./об.	0,004 % масс./об.	0,004 % масс./об.
Разбавленный раствор HCl (10 %)	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0

Приготовление композиций по примерам 1-4.

Композиции по примерам 1-4 готовили в объеме 0,5 л.

Приготовление буфера.

Предварительно готовят 0,6 л гистидинового буфера с концентрацией 5, 10, 15 или 25 мМ, в зависимости от концентрации, приведенной в табл. 1. Измеряют pH и при необходимости доводят pH раствора до 4,8-5,3 10% раствором кислоты хлористоводородной.

Приготовление раствора плацебо.

С использованием гистидинового буфера готовят 0,15 л раствора, содержащего 10 г сахарозы и 20 г маннитола. В отдельной емкости в гистидиновом буфере растворяют 20 мг полисорбата-20, доводят объем до 0,007 л. В мерную колбу объемом 0,2 л количественно переносят полученные растворы во всем приготовленном объеме. Измеряют pH, при необходимости доводят pH 10% раствором кислоты хлористоводородной до pH 4,8-5,3, далее объем доводят до 0,2 л гистидиновым буфером.

Приготовление композиций с концентрацией ромиплостима 0,5 мг/мл.

В мерную колбу вместимостью 0,5 л с навеской ромиплостима 0,2500 г, добавляют 0,26 л гистидинового буфера, перемешивают до полного растворения ромиплостима. Измеряют pH, при необходимости доводят pH до 4,8-5,3 10% раствором кислоты хлористоводородной. Прибавляют раствор плацебо во всем приготовленном объеме. Доводят объем до 0,5 л гистидиновым буфером.

Полученные растворы фильтруют через полиэфирсульфоновый фильтр 0,22 мкм, разливают в стерильных условиях по 0,75 мл (для доставляемой дозы 250 мкг) или 1,5 мл (для доставляемой дозы 500 мкг) во флаконы объемом 3 мл, прекупоривают пробками и подвергают лиофилизации. По окончании лиофилизации флаконы закупоривают алюминиевым колпачком.

Стабильность полученных лиофилизатов изучали при следующих условиях: в течение 28 суток при температуре $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(75 \pm 5)\%$, в течение 6 месяцев при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(60 \pm 5)\%$.

Результаты изучения стабильности по показателю чистота (% основного пика) методами RP-HPLC, CE-HPLC и SE-HPLC показали, что концентрация гистидинового буфера, варьирующая от 5 до 25 мМ, не оказывает влияния на стабильность. Для дальнейших исследований был выбран 25 мМ гистидиновый буфер с наибольшей буферной емкостью для обеспечения максимальной буферной стабильности.

С целью изучения влияния замены поверхностно-активного вещества полисорбата-20 на полоксамер 188 были приготовлены композиции по примерам 6-10 (табл. 2) с качественным и количественным составом аналогичным составу композиции 4 за исключением того, что в качестве ПАВ был использован полоксамер 188 с концентрацией от 0,004% мас./об. до 1% мас./об. В качестве контроля была приготовлена композиция 5, воспроизводящая состав композиции 4.

Приготовление композиции 5 осуществляют аналогично композиции 4. Приготовление композиций 6-10 осуществляют аналогично композиции 4, за исключением того, что вместо полисорбата-20 используют полоксамер 188 в количествах, приведенных в табл. 2.

Таблица 2
Качественный и количественный состав композиций 5-10

Номер композиции	5 (контроль)	6	7	8	9	10
Ромиплостим	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл
L-гистидин	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Маннитол	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.	4 % масс./об.
Сахароза	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.	2 % масс./об.
Полисорбат 20	0,004 % масс./об.	–	–	–	–	–
Полоксамер 188	–	0,004 % масс./об.	0,05 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,1 % масс./об.	1 % масс./об.
Разбавленный раствор HCl (10 %)	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0

Стабильность полученных лиофилизатов изучали при следующих условиях: в течение 28 суток при температуре $(40\pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(75\pm 5)\%$, в течение 6 месяцев при температуре $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(60\pm 5)\%$. Результаты изучения стабильности по показателю чистота (% основного пика) методами RP-HPLC, CEX-HPLC и SE-HPLC (табл. 3, фиг. 1-3) показали, что при использовании полоксамера 188 в любой из концентраций (от 0,004 мас./об., до 1 мас./об.) стабильность композиций лучше, чем при использовании полисорбата 20.

Таблица 3
Результаты изучения стабильности композиций 5 - 10 по показателю "Чистота, % основного вещества" методами RP-HPLC, CEX-HPLC, SE-HPLC

Номер композиции	$(40\pm 2)^\circ\text{C}; (75\pm 5) \%$				$(25\pm 2)^\circ; (60\pm 5) \%$	
	RP-HPLC					
	0 суток	7 суток	14 суток	28 суток	3 месяца	6 месяцев
5	98,4	98,2	98,0	97,6	98,0	97,5
6	98,3	98,4	98,3	97,8	98,0	97,5
7	98,4	98,4	98,2	98,1	98,2	98,0
8	98,5	98,4	98,3	98,3	98,4	98,3
9	98,4	98,3	98,3	98,2	98,4	98,2
10	98,5	98,4	98,3	98,2	98,4	98,3
	CEX-HPLC					
5	98,4	98,2	98,1	97,6	97,5	97,5
6	98,5	98,4	98,2	97,9	98,3	98,0
7	98,5	98,4	98,3	98,1	98,3	98,1
8	98,6	98,4	98,3	98,4	98,6	98,5
9	98,5	98,2	98,3	98,3	98,5	98,3
10	98,4	98,4	98,3	98,3	98,2	98,2
	SE-HPLC					
5	99,4	99,2	99,1	98,6	99,0	98,5
6	99,5	99,4	99,2	98,9	99,3	99,0
7	99,5	99,3	99,3	99,1	99,3	99,1
8	99,5	99,4	99,3	99,4	99,5	99,4
9	99,4	99,3	99,2	99,2	99,4	99,3
10	99,4	99,4	99,3	99,1	99,3	99,1

Повышение стабильности, а именно уменьшение продуктов химической деградации ромиплостима при замене полисорбата-20 на полоксамер 188 можно объяснить тем, что полоксамер 188 вследствие отсутствия в своей химической структуре сложноэфирной связи и ненасыщенной алкильной цепи по сравнению с полисорбатом 20 менее подвержен окислению и гидролизу, вследствие чего в композициях на-

капливается меньше реакционноспособных продуктов разложения ПАВ, взаимодействующих с ромиплостимом. Уменьшение агрегации ромиплостима при использовании полоксамера 188 обусловлено как лучшей стабильностью полоксамера 188 по сравнению с полисорбатом 20, так и повышением его концентрации. Таким образом, замена ПАВ и повышение концентрации ПАВ в составе композиций являются целесообразными. Оптимальная концентрация полоксамера 188 от 0,05 до 1% мас./об., предпочтительно 0,07% мас./об.

Следующим этапом разработки было изучение влияния замены сахарозы на трегалозу, а также определение оптимального соотношения маннитол:трегалоза при оптимальной концентрации полоксамера 188.

Готовят композиции 11-15 с различным соотношением маннитол:трегалоза, варьируя количество трегалозы и корректируя уровень маннитола так, чтобы осмолярность готовых композиций была в физиологическом диапазоне (консенсусный диапазон для подкожного введения 269-360 мОсм/кг). Осмолярность крови - около 300 мОсм/кг. По данным литературных источников для ощутимого болезненного эффекта от введения осмолярность должна составлять более 600 мОсм/кг. Принято, что препараты для инъекций должны быть приготовлены в виде изотонических растворов (осмоляльность около 300 мОсм/кг) [15,16].

Таблица 4
Качественный и количественный состав композиций 11-15

Номер композиции	11	12	13	14	15
Ромиплостим	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл	0,50 мг/мл
L-гистидин	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Маннитол	4 % масс./об.	4,5 % масс./об.	3 % масс./об.	1,5 % масс./об.	2 % масс./об.
Трегалоза	2 % масс./об.	1,5 % масс./об.	3 % масс./об.	4,5 % масс./об.	4 % масс./об.
Полоксамер 188	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.
Разбавленный раствор HCl (10 %)	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0

Композиции 11-13 обладает лучшей стабильностью по сравнению со стабильностью композиций 1-10. Согласно данным, представленным в табл. 5, и как видно на фиг. 4-6, наиболее предпочтительными являются соотношения маннитол:трегалоза 2:1, 3:1 и 1:1 (композиции 11, 12 и 13). С увеличением содержания трегалозы в составе (композиции 14 и 15) чистота лиофилизата, определяемая в процессе ускоренного хранения ((25±2)°C; (60±5)%) и хранения в стресс-условиях ((40±2)°C, (75±5)%) падает, составы приобретают неудовлетворительный внешний вид.

Таблица 5
 Результаты изучения стабильности композиций 11-15 по показателю "Чистота,% основного вещества"
 методами RP-HPLC, CEX-HPLC, SE-HPLC

Номер композиции	(40±2)°C; (75±5) %				(25±2)°; (60±5) %	
	RP-HPLC					
	0 суток	7 суток	14 суток	28 суток	3 месяца	6 месяцев
11	98,9	98,7	98,7	98,6	98,3	98,5
12	98,8	98,7	98,7	98,4	98,6	98,4
13	98,9	98,7	98,6	98,5	98,7	98,5
14	98,7	98,6	98,4	98,1	97,7	97,8
15	98,8	98,5	98,4	98,0	98,5	98,0
	CEX-HPLC					
11	98,9	98,8	98,7	98,7	98,5	98,6
12	98,8	98,7	98,6	98,6	98,7	98,4
13	98,9	98,7	98,7	98,5	98,8	98,5
14	98,8	98,7	98,5	98,00	98,5	97,9
15	98,7	98,6	98,4	98,1	98,3	97,8
	SE-HPLC					
11	99,6	99,6	99,4	99,3	99,5	99,3
12	99,5	99,4	99,5	99,3	99,3	99,1
13	99,5	99,3	99,2	99,2	99,3	99,2
14	99,6	99,3	99,00	98,6	99,0	98,8
15	99,5	99,2	98,9	98,7	98,3	98,4

С целью оценки влияния незначительных изменений концентрации ромиплостима в растворе до лиофилизации на стабильность были приготовлены композиции 16-19 в диапазоне концентраций ромиплостима от 0,45 до 0,55 мг/мл. Композиции 16-19 были приготовлены вышеописанным способом с качественным и количественным составом, приведенным в табл. 6. В связи с изменением концентрации активной субстанции в композициях был изменен объем раствора, помещаемый во флакон для последующей лиофилизации, таким образом, чтобы содержание активной субстанции во всех флаконах (для композиций 16-19) было равным 375 мкг.

Результаты изучения стабильности по показателю чистота (% основного пика) методами RP-HPLC, CEX-HPLC, SE-HPLC не показали статистически значимых различий между композициями 16-19.

Таблица 6
 Качественный и количественный состав композиций 16-19

Номер композиции	16	17	18	19
Ромиплостим	0,45 мг/мл	0,5 мг/мл	0,521 мг/мл	0,55 мг/мл
L-гистидин	25 мМ	25 мМ	25 мМ	25 мМ
Маннитол	3,6 % масс./об.	4 % масс./об.	4,2 % масс./об.	4,4 % масс./об.
Трегалоза	1,8	2 масс.%/об.%	2,1 масс.%/об.%	2,2 масс.%/об.%
Полоксамер 188	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.	0,07 % масс./об.
Разбавленный раствор HCl (10 %)	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0	до pH 5,0
Объем композиции во флаконе с доставляемой дозой 250 мкг*	0,833 мл	0,75 мл	0,72 мл	0,682 мл

* Фактическое содержание ромиплостима во флаконе с доставляемой дозой 250-375 мкг.
 Композиции 11, 12, 13, 16-19 стабильны как при долгосрочном хранении в холодильнике (2-8°C) (в

течение минимум 2 лет), так и при ускоренном хранении.

В процессе хранения композиций 11, 12, 13, 16-19 определяли также и специфическую биологическую активность. Определение проводили в тесте *in vitro* по валидированной методике. Была использована клеточная линия 32D Clone 3 трансфицированная человеческим тромбопоэтиновым рецептором. В ответ на добавление ромиплостима, дозозависимо изменялась скорость пролиферации клеток, которую детектировали методом флуоресценции.

Статистически значимых изменений в биологической активности по сравнению с исходной при хранении не происходит (см. табл. 7 и 8).

Таблица 7
Результаты определения биологической активности в процессе ускоренного хранения ((25±2)°C; (60±5)%)

Номер композиции	% стандартной активности (от 80 до 125 %)		
	0 мес.	3 мес.	6 мес.
11	108	98	119
12	103	86	114
13	99	101	109
16	102	99	111
17	98	101	117
18	118	109	116
19	92	113	99

Таблица 8
Результаты определения биологической активности в процессе долгосрочного хранения при 2-8°C

Номер композиции	% стандартной активности (от 80 до 125 %)					
	0 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.	18 мес.	24 мес.
11	99	95	100	98	119	105
12	100	97	105	101	99	113
13	95	105	110	105	96	111
16	103	95	111	98	100	99
17	95	103	115	96	110	106
18	105	98	113	103	101	102
19	91	102	95	112	101	96

Проведена оценка стабильности предлагаемых в изобретении композиций в диапазоне концентраций ромиплостима от 0,1 до 1 мг/мл в условиях ускоренного хранения и в стресс-условиях. Было показано, что полксамер 188 в диапазоне концентраций от 0,004 до 1% мас./об, ингибирует агрегацию и химическую деградацию во всем изученном диапазоне концентраций ромиплостима. Повышение концентрации ромиплостима выше 1 мг/мл не представляет интерес в связи с низкой дозировкой ромиплостима в клинике. Использование композиций с концентрациями ромиплостима ниже 0,5 мг/мл может способствовать более точному дозированию при розливе во флаконы, поскольку ошибка измерения объема уменьшается с увеличением измеряемого объема.

Для оценки влияния pH на стабильность были приготовлены композиции с качественным и количественным составом, соответствующим составам 17 и 18 с использованием гистидинового буфера, pH которого варьировали от 4 до 6. Изменение pH композиций в диапазоне от 4 до 6 не оказывает влияния на стабильность композиций.

Список литературы.

1. Kuter D. J., Begley C. G. Recombinant human thrombopoietin: Basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood*. 2002; 100 (10): 3457–3469. doi: 10.1182/blood.V100.10.3457
2. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Энплейт (NPLATE). URL: <http://grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения 31.05.21).
3. Mytych D. T., Park J. K., Kim J. et al. Assessment of romiplostim immunogenicity in adult patients in clinical trials and in a global postmarketing registry. *British Journal of Haematology*, 2020; 190 (6), 923 – 932. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-113484>
4. Grassi L., Cabrele C. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions. *Amino Acids*. 2019; 51: 1409–1431. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02787-2>
5. Zapadka K. L., Becher F. J., Gomes dos Santos A. L., Jackson S. E. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus*. 2017; 7(6):1–16 doi:10.1098/rsfs.2017.0030
6. Аршинова О. Ю., Оборотова Н. А., Санарова Е. В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2013; 1(2):20 – 25.
7. Edward T. Maggio. Polysorbates, peroxides, protein aggregation, and immunogenicity – a growing concern. *J. Excipients and Food Chem*. 2012; 3 (2): 45 – 53.
8. Kerwin B. A. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 97(8), 2924–2935. doi:10.1002/jps.21190
9. Frison-Norrie S., Sporns, P. Investigating the Molecular Heterogeneity of Polysorbate Emulsifiers by MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(7): 3335–3340. doi:10.1021/jf010096w
10. Donbrow M., Azaz E., Pillersdorf A. Autoxidation of Polysorbates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1978; 67(12), 1676–1681. doi:10.1002/jps.2600671211
11. Zhou J., Qiu J., Jiang G., Zhou C., Bingham N., Yeung H., Tressel T. Non-specific binding and saturation of Polysorbate-20 with aseptic filter membranes for drug substance and drug product during mAb production. *Journal of Membrane Science*. 2008; 325(2): 735–741. doi:10.1016/j.memsci.2008.08.046
12. ICH Topic Q1A Stability testing of new drug substances and products.
13. ICH Topic Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
14. ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. CPMP/ICH/365/96 September 1999.
15. Usach I., Martinez R., Festini T., Peris J.-E. Subcutaneous Injection of Drugs: Literature Review of Factors Influencing Pain Sensation at the Injection Site. *Advances in Therapy*. 2019; 36: 2986 – 2996. doi:10.1007/s12325-019-01101-6
16. Wang W. Tolerability of hypertonic injectables. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015; 490: 308 – 315. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.069>

Перечень фигур, чертежей и иных материалов

Фиг. 1. Изучение стабильности композиций 5-10 методом RP-HPLC (условия хранения: $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$; $(75 \pm 5)\%$).

Фиг. 2. Изучение стабильности композиций 5-10 методом СЕХ-HPLC (условия хранения: $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$; $(75 \pm 5)\%$).

Фиг. 3. Изучение стабильности композиций 5-10 методом SE-HPLC (условия хранения: $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$; $(75 \pm 5)\%$).

Фиг. 4. Изучение стабильности композиций 11-15 методом RP-HPLC (условия хранения: $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$; $(75 \pm 5)\%$).

Фиг. 5. Изучение стабильности композиций 11-15 методом СЕХ-НPLC (условия хранения: $(40\pm 2)^\circ\text{C}$; $(75\pm 5)\%$).

Фиг. 6. Изучение стабильности композиций 11-15 методом SE-HPLC (условия хранения: $(40\pm 2)^\circ\text{C}$; $(75\pm 5)\%$).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая ромиплостим, в виде раствора для внутривенного или подкожного введения, отличающаяся тем, что в качестве вспомогательных веществ содержит гистидиновый буфер, маннитол, трегалозу и полоксамер 188, где

- а) концентрация ромиплостима от 0,1 до 1,0 мг/мл;
 - б) концентрация гистидинового буфера от 5 до 25 мМ, рН 4-6;
 - в) концентрация маннитола от 3 до 4,5% мас./об.;
 - г) концентрация трегалозы от 1,5 до 3% мас./об.;
 - д) концентрация полоксамера 188 от 0,004 до 1% мас./об.,
- где концентрация маннитола и трегалозы находится в соотношении от 1:1 до 3:1.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая ромиплостим в виде раствора для лиофилизации, отличающаяся тем, что в качестве вспомогательных веществ содержит гистидиновый буфер, маннитол, трегалозу, полоксамер 188, где

- а) концентрация ромиплостима от 0,1 до 1,0 мг/мл;
 - б) концентрация гистидинового буфера от 5 до 25 мМ, рН 4-6;
 - в) концентрация маннитола от 3 до 4,5% мас./об.;
 - г) концентрация трегалозы от 1,5 до 3% мас./об.;
 - д) концентрация полоксамера 188 от 0,004 до 1% мас./об.,
- где концентрация маннитола и трегалозы находится в соотношении от 1:1 до 3:1.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что

- а) концентрация ромиплостима составляет 0,5 мг/мл;
- б) концентрация гистидинового буфера составляет 25 мМ, рН 4.8-5.3;
- в) концентрация маннитола составляет 4% мас./об.;
- г) концентрация трегалозы составляет 2% мас./об.;
- д) концентрация полоксамера 188 составляет 0,07% мас./об.,

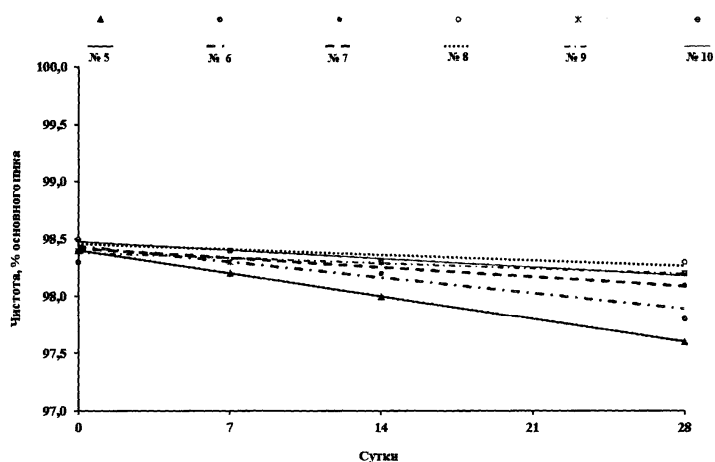
где указанные концентрации представляют собой концентрации в растворе до лиофилизации.

4. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что

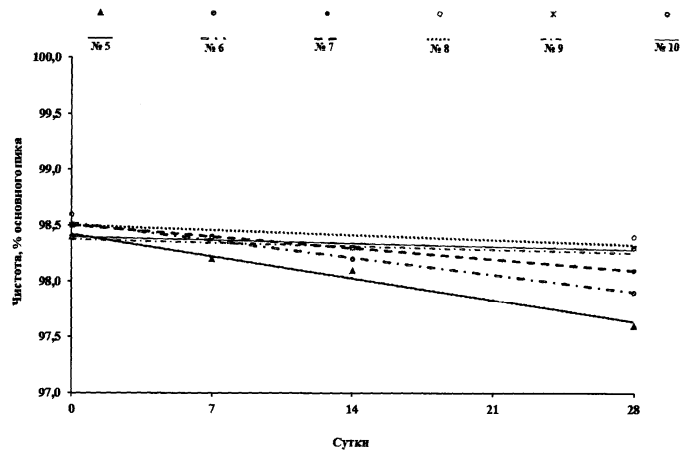
- а) концентрация ромиплостима составляет 0,521 мг/мл;
- б) концентрация гистидинового буфера составляет 25 мМ, рН 4.8-5.3;
- в) концентрация маннитола составляет 4,2% мас./об.;
- г) концентрация трегалозы составляет 2,1% мас./об.;
- д) концентрация полоксамера 188 составляет 0,07% мас./об.,

где указанные концентрации представляют собой концентрации в растворе до лиофилизации.

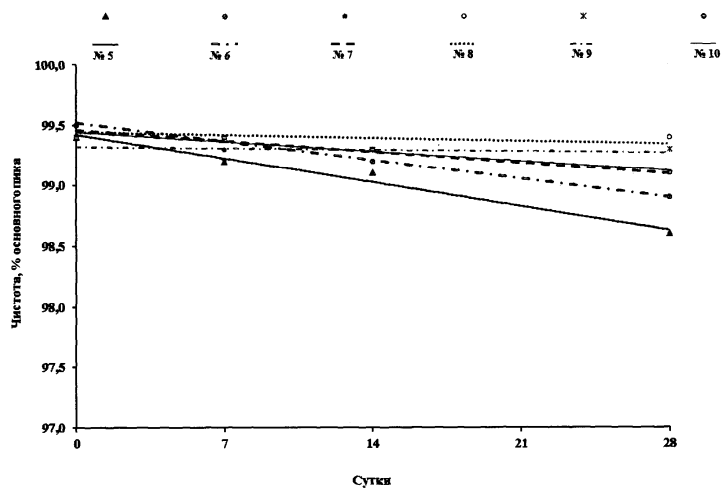
5. Лиофилизат для приготовления раствора ромиплостима для внутривенного или подкожного введения, отличающийся тем, что получен из композиций по пп.2-4.



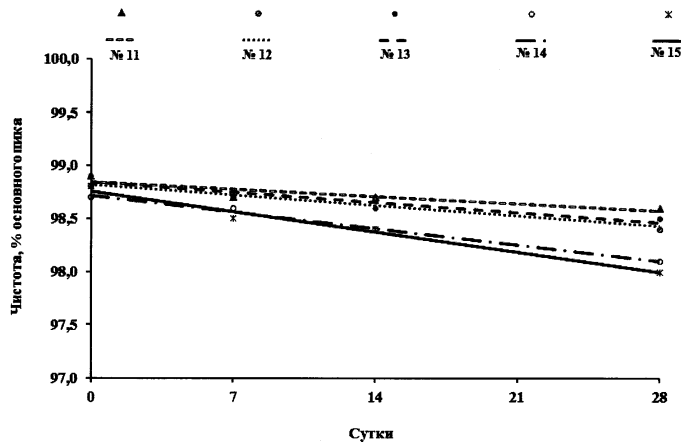
Фиг. 1



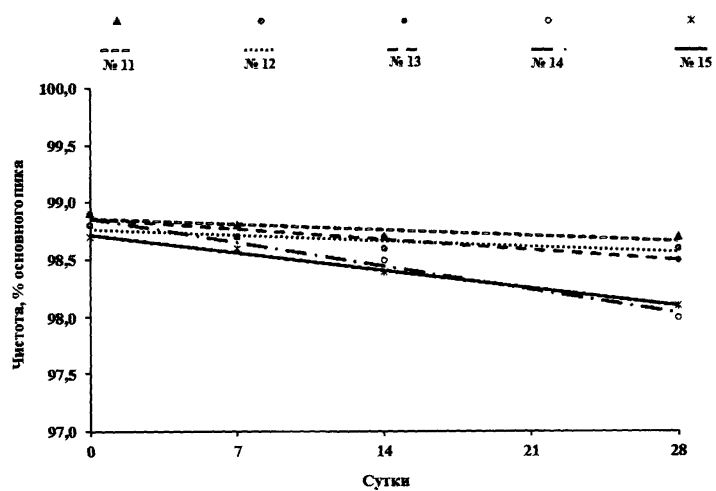
Фиг. 2



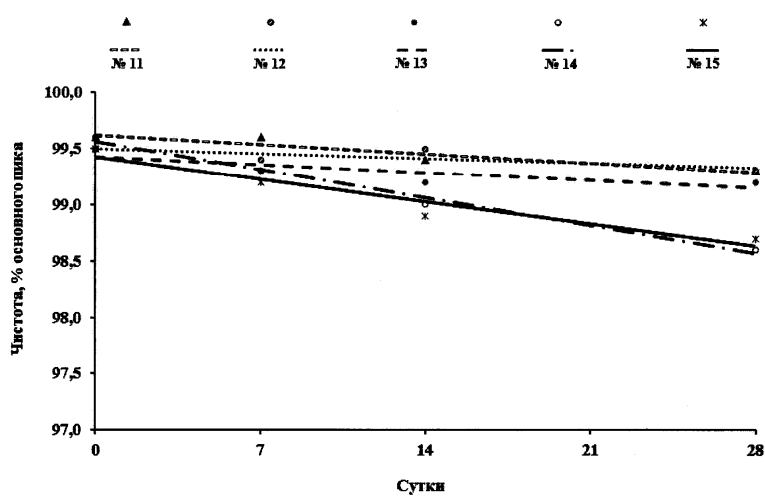
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

