

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391187** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.30**

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 9/19* (2006.01)  
*A61K 38/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.10.06**

---

(54) **СТАБИЛЬНЫЙ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ БЕЛОК**

---

(31) **62/405,610**

(72) Изобретатель:

(32) **2016.10.07**

**Тан Сяолин, Людвиг Дэвид Бретт  
(US)**

(33) **US**

(62) **201990900; 2017.10.06**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

---

(57) Предлагаются стабильные лиофилизированные терапевтические белковые композиции и способы их получения. В частности, описано использование воды в качестве пластификатора твердого остатка и стабилизатора белка. Также описано включение многокомпонентного стабилизатора, содержащего более крупную молекулярную единицу и меньшую молекулярную единицу. Также включение отжига после сушки в определенных условиях улучшает стабильность белка. Прогнозируется, что белки останутся стабильными в течение 24 месяцев при 25°C.

---

**202391187**

**A1**

**A1**

**202391187**

**СТАБИЛЬНЫЙ ПРИ КОМНАТНОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ БЕЛОК**

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Данное изобретение в целом относится к области фармацевтической композиции биологических молекул. В частности, данное изобретение относится к стабильным лиофилизированным терапевтическим белковым композициям.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Терапевтические макромолекулы, такие как антитела и рецепторные Fc-слитые белки, должны быть сформированы таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но и сохранить их стабильность при длительном хранении. Например, терапевтические белки (например, антитела) в жидком растворе склонны к агрегации, химическим модификациям или другим формам деградации, если раствор сформирован неправильно. Стабильность терапевтического белка в жидкой композиции зависит не только от типов наполнителей, используемых в композиции и от количества и пропорций этих наполнителей относительно друг друга, но также от концентрации растворимого белка и способа производства. Соображения помимо стабильности также должны быть приняты во внимание при получении терапевтической белковой композиции. Эти соображения включают в себя вязкость раствора и концентрацию антител, которые могут быть учтены в данной композиции. Таким образом, при получении терапевтического белка необходимо проявлять большую осторожность, чтобы получить композицию, которая остается стабильной в течение времени при температуре хранения, содержит адекватную концентрацию антитела или другого терапевтического белка и имеет другие свойства, которые позволяют удобно вводить композицию пациентам.

[0003] Жидкие композиции терапевтических белков, как правило, предназначены для обеспечения долгосрочной стабильности белка при замораживании или охлаждении, но часто не обеспечивают длительной стабильности при комнатной температуре. Одно решение, известное в данной области техники для сохранения стабильности и сохранения терапевтической активности белка, заключается в

лиофилизации молекулы. Лиофилизация (лиофильная сушка в контролируемых условиях) обычно используется для длительного хранения белков. Лиофилизированный белок является по сути устойчивым к деградаци, такой как агрегация, окисление и другие дегенеративные процессы, когда он находится в лиофилизированном состоянии (см., например, патент США № 6,436,897). Лиофилизация обеспечивает сухой «остаток», который остается относительно стабильным при комнатной температуре в течение относительно длительного периода времени. Стабильность при комнатной температуре особенно важна для хранения и распределения терапевтических белков по всему миру, особенно в местах, где электричество и охлаждение ненадежны.

[0004] Лиопротекторы (также известные как стабилизаторы), такие как сахароза и трегалоза, часто включаются в композицию для предварительной лиофилизации, чтобы защитить белок от денатурации в процессе лиофилизации. Пластификаторы также могут быть включены для уменьшения общего времени релаксации и в некоторых случаях могут помочь сохранить нативную структуру белков. Пластификаторы включают сахарные спирты, такие как сорбитол и глицерин, другие полиолы и небольшое количество воды.

[0005] В исследованиях, направленных на оптимизацию хранения лиофилизированных белков при 5°C, Chang *et al.* исследовали влияние пластификаторов на стабильность белковых композиций. В лиофилизированных остатках, которые содержали весовое соотношение 1:1 сахарозы к белку (предварительно лиофилизированный белок с концентрацией 40 мг/мл) и без дополнительных пластификаторов, константа скорости агрегации в течение месяца при 50°C, как сообщалось, была выше 1,5% при содержании воды 2,4% и около 2% при содержании воды 3,3% (*Id.* в 1451, Фиг. 4). ("Effect of Sorbitol and Residual Moisture on the Stability of Lyophilized Antibodies: Implications for the Mechanism of Protein Stabilization in the Solid State," *J. Pharma.* 94 (7): 1445-1454 (2005)). Эксперимент также проводился при 40°C и 25°C с данными, представленными только для самых жестких из трех стрессовых условий. Chang *et al.* отметил редкие

примеры документированных случаев оптимальной стабильности при хранении при промежуточном содержании влаги и предположил, что содержание остаточной влаги следует оптимизировать при разработке композиции, а не что-то, что просто нужно минимизировать. (Там же, 1451; см. также Breen *et al.*, "Effect of Moisture on the Stability of a Lyophilized Humanized Monoclonal Antibody Formulation," *Pharma. Res.* 18 (9):1345-1353 (2001).) Высокие уровни влаги были показаны во всех исследованиях, приведенных Chang *et al.* чтобы уменьшить химическую стабильность составов. Hsu *et al.* "Determining the Optimum residual Moisture in Lyophilized Protein Pharmaceuticals," *Develop. Biol. Стандарт* 74: 255-271 (1991).)

[0006] Ни одно из этих исследований не предполагает длительной стабильности (более года, двух лет или трех лет или более) при температуре выше 5°C, не говоря уже о 25°C, даже для протестированных композиций.

[0007] Лиофилизированные композиции биотерапевтических препаратов продемонстрировали длительную стабильность при определенных условиях. Kallmeyer *et al.*, WO1998022136A2, описывает стабильные композиции лиофилизированных антител низкой концентрации (например, до 8 мг/мл предварительно лиофилизированного раствора), которые содержат среди других наполнителей сахар (до 200 мг/мл после восстановления [например, сахароза, лактоза, мальтоза, рафиноза, трегалоза]), аминокислоту (1-100 мг/мл предварительно лиофилизированная [например, аргинин, лизин, орнитин]), поверхностно-активное вещество (от 0,05 до 0,5 мг/мл после восстановления [например, полисорбаты иполиоксиэтилен - полиоксипропиленовые полимеры]) и, необязательно, буфер (10-20 мМ после восстановления [например, фосфат, ацетат, цитрат]) и/или изотонизирующий агент (например, NaCl, не более 30 мМ после восстановления). Kallmeyer описывает, что лиофилизат может храниться при комнатной температуре (т.е. 18-23°C) до двух лет, оставаясь стабильным. В данном документе, стабильность демонстрируется образованием очень маленьких или вообще никаких частиц в восстановленном лиофилизате, то есть,

менее 6000 частиц размером более 10 микрон или менее 600 частиц размером более 25 микрон.

[0008] Dix *et al.*, WO2006104852A2, описывают стабильную лиофилизированную композицию VEGF-Trap (он же афлиберцепт), которая поддерживает биологическую активность в течение, по меньшей мере, трех месяцев. Эта заявка описывает предварительно лиофилизированный раствор, содержащий 5-75 мг/мл молекулы-ловушки, 5-50 мМ гистидинового буфера, 0,1-3% полиэтиленгликоля (ПЭГ; стабилизатор), 0,25-3% глицина (в качестве наполнителя) и 0,5-6% сахарозы (в качестве стабилизатора). Необязательно, предварительно лиофилизированный раствор содержит цитратный буфер (0,05 мМ) и/или от 0,003% до 0,005% полисорбата.

[0009] В дополнение к лиофилизированным белковым композициям для получения сухих белковых композиций также применяется распылительная сушка. Chen и Walsh (WO201307506A1) описывают сухие частицы микронизированного белка, имеющие диапазон диаметров от двух (2) до 30 микрон и средний диаметр от около 10 до 12 микрон и в некоторых случаях от около 6 до около 7 микрон. Эти частицы могут быть впоследствии покрыты полимером для дальнейшей стабилизации белка и обеспечения продолжительного высвобождения белка со временем в водной среде. Предварительно обработанный раствор белка, из которого были получены микронизированные частицы, содержал (1) 25 мг/мл белка и 0,1% полисорбата, (2) 25 мг/мл белка или (3) 50 мг/мл белка, 10 мМ фосфата и 2% сахарозы. Было показано, что белок, содержащийся в частицах микронизированного белка с полимерным покрытием, остается стабильным в течение по меньшей мере 14 дней.

[00010] Было показано, что отжиг после высушивания лиофилизата белка при 50°C приводит к начальной агрегации антител, превышающей 4% и константа скорости агрегации составляет около 2% агрегации в месяц. (См. Wang *et al.*, "The Impact of Thermal Treatment on the Stability of Freeze-Dried Amorphous Pharmaceuticals: II. Aggregation in an IgG1 Fusion Protein," 99(2) *J. Pharma. Sci.* 683-700 (2010).) Хотя FDA США может разрешить маркетинг композиции с начальной агрегацией 4%,

такая скорость агрегации с течением времени будет неприемлемой для продаваемого фармацевтического препарата. В течение срока годности фармацевтической композиции не должно быть видимых изменений.

[00011] Сохраняется потребность в универсальных сухих белковых композициях, которые остаются стабильными в течение длительного периода времени при комнатной температуре. Универсальные сухие белковые композиции, среди прочего, пригодны для восстановления с использованием в виде жидких композиций, для объединения с полимерами с получением композиций или препаратов с пролонгированным высвобождением и для имплантации или доставки посредством множества других способов. В данном документе, заявители разработали улучшенный стабильный лиофилизат белка и способ его получения.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00012] Относительно высокое содержание остаточной влаги может служить эффективным пластификатором для лиофилизированных терапевтических белков (так называемые терапевтические белки в «твердом состоянии»), который обеспечивает удивительную стабильность белка в течение по меньшей мере 24 месяцев хранения при комнатной температуре. В одном аспекте предложена стабильная при комнатной температуре композиция лиофилизированного терапевтического белка в твердом состоянии с низкой подвижностью, имеющая влажность от 0,5 до 10 процентов. В другом аспекте предложен способ получения этой лиофилизированной терапевтической белковой композиции, стабильной при комнатной температуре. В частности, уровни остаточной влажности более 2%, более 3%, более 4%, более 5% или более 6% в лиофилизированном остатке, но менее 10%, менее 8%, менее 7% или менее 6% позволяют отжигать при относительно высоких температурах в течение длительного периода времени при комнатной температуре. Хотя это и не ограничено каким-либо механизмом действия, остаточное содержание воды во время процесса лиофилизации, по-видимому, позволяет осуществлять альфа-релаксацию, в то же время, предотвращая образование исходных белковых агрегатов при относительно высоких концентрациях фармацевтической композиции,

предпочтительно от 50 до 200 мг/мл, еще более предпочтительно от 100 до 150 мг/мл.

[00013] В первом аспекте фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит стабильный белок, наполнитель и от около 0,5% до около 10% воды, от около 3% до около 6% воды, от около 4% до около 7% воды, от около 5% до около 8% воды, около 3%, около 4%, около 4,5% или около 6% воды по массе. Белок фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка остается стабильным в течение по меньшей мере одного месяца при комнатной температуре, которая может составлять 17-25°C, 20-25°C или около 25°C. В целом, под «стабильным» подразумевается то, что менее чем 5%, менее чем 4%, менее чем 3%, менее чем 2%, менее чем 1% или очень мало или ни один из белков не деградирует в течение 18 месяцев хранения при комнатной температуре. Общим путем деградации белков является образование агрегатов и других высокомолекулярных (НМВ) видов. НМВ виды могут быть обнаружены многими известными способами, такими как эксклюзионная хроматография и подвижность нативного или денатурированного электрофоретического геля, предпочтительно эксклюзионная хроматография. Деградация также включает образование химических продуктов, таких как дезамидированные остатки, восстановленные дисульфидные связи, гидролиз и фрагментацию пептидов и тому подобное, которые также могут быть измерены способами, известными в данной области.

[00014] В одном варианте реализации менее чем или около 2% белка деградирует после 24 месяцев хранения при температуре около 25°C. Деградация определяется процентным изменением высокомолекулярных частиц, измеренным методом эксклюзионной хроматографии. Нижний предел обнаруживаемой деградации с помощью этого метода составляет около 0,5%, а вариабельность анализа составляет около 0,2-0,3%.

[00015] Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток может включать один или несколько наполнителей в дополнение к белку и влаге. В одном варианте реализации наполнители включают буфер. Этот буфер может быть любым буфером,

который поддерживает оптимальный рН для стабильности белка. Гистидин является таким буфером, который имеет рКа около 6,0 и способен эффективно буферизовать между рН от 4,8 до 7,2. В некоторых вариантах реализации наполнителем является гистидин. В предпочтительном варианте реализации гистидин присутствует в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке в количестве от около 0,34% до около 2,04% по весу.

[00016] В одном варианте реализации наполнители включают стабилизатор. Стабилизаторы включают различные молекулы, такие как полиолы, сахара, аминокислоты, соли или любые их комбинации. Примеры используемых стабилизаторов включают сорбитол, глицерин, маннитол, трегалозу, сахарозу, аргинин, аланин, пролин, глицин, хлорид натрия или любую их комбинацию. В одном варианте реализации стабилизатор составляет от около 19,9% до около 82,2% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

[00017] Термин «стабилизатор» означает по меньшей мере один химический объект, который не является буфером или белком в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке. В некоторых вариантах реализации термин стабилизатор означает комбинацию химических элементов (*то есть*, более чем один химический элемент), которые вместе служат для стабилизации белка или другой макромолекулы. Например, стабилизатор может представлять собой сахарозу или стабилизатор может представлять собой комбинацию сахарозы и аргинина. В некоторых вариантах реализации высокомолекулярное химическое вещество, такое как, *например*, сахароза или трегалоза, комбинируется с низкомолекулярным химическим веществом, таким как, *например*, аргинин, пролин, аланин, глицин, маннитол, сорбитол и/или глицерин. Не желая быть связанными теорией, меньший химический объект увеличивает подвижность, позволяя белку релаксировать до более низкого энергетического состояния.

[00018] В одном варианте реализации стабилизатор представляет собой только сахарозу, и этот стабилизатор составляет от около 3% до около 15%, предпочтительно около 5-11%, 4-7,5% или 5-7,5% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка в зависимости от присутствия других

компонентов стабилизатора и количества белка, воды и других вспомогательных веществ. В одном варианте реализации массовое соотношение белка к стабилизатору составляет от 1:1 до 3:1, предпочтительно от 1,2:1 до 2:1, более предпочтительно от 1,5:1.

[00019] В одном варианте реализации стабилизатор включает сахарозу в комбинации с другим стабилизирующим агентом. Эти другие стабилизирующие агенты в комбинации с сахарозой включают любой один или несколько из аргинина, сорбитола, маннитола, глицерина и аланина. В одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аргинин, который может составлять от около 4,83% до около 19,3% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В некоторых вариантах реализации соотношение массы сахарозы к массе аргинину составляет от около 3,2:1 до около 3,4:1. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит сорбитол, который может составлять от около 8,07% до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит маннитол, который может составлять от около 8,07% до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит глицерин, который может составлять от около 4,23% до около 12,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В еще одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аланин, который может составлять от около 4,11% до около 12,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

[00020] В другом варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу, которая составляет от около 15,8% до около 70,2% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка, в зависимости от присутствия других стабилизаторов и количества белка, воды и других наполнителей.

[00021] В одном варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу в комбинации с другим стабилизатором. Эти другие стабилизаторы в комбинации с трегалозой включают любой один или несколько из аргинина, сорбитола, маннитола, глицерина и

аланина. В одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аргинин, который может составлять от около 0,81% до около 14,3% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит сорбитол, который может составлять от около 1,35 до около 22,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В другом варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит глицерин, который может составлять от около 0,69% до около 12,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В еще одном варианте реализации дополнительный стабилизатор содержит аланин, который может составлять от около 0,69% до около 12,4% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка.

[00022] В другом варианте реализации, наполнители содержат поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество может содержать неионогенный детергент, такой как жирный ацилированный полиэтоксилированный сорбитан. В одном варианте реализации поверхностно-активное вещество обычно включает полисорбат или, в частности, полисорбат 80. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 0,21% до около 0,96% поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат 80, по массе.

[00023] В одном варианте реализации белок представляет собой терапевтический белок. В другом варианте реализации терапевтический белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки охватывают разнообразную группу молекул, включая антитела, фрагменты антител, рецепторы, лиганды, рекомбинантные молекулы, включая определяющие комплементарность области, лиганды и рецепторные домены. Антигенсвязывающие белки включают различные другие слитые (рекомбинантные или химерные) белки, такие как рецепторные Fc-слитые белки, которые включают молекулы-ловушки. В конкретном варианте реализации белок представляет собой терапевтическое антитело, такое как рекомбинантное человеческое или

гуманизированное моноклональное антитело. Антитела включают в себя гибридные антитела, а также биспецифические антитела.

[00024] В одном варианте реализации белок составляет от около 6,27% до около 63,7% от веса фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 6,27% до около 18,9% белка по массе. В других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит от около 33,4% до около 63,7% белка по массе.

[00025] Стабилизаторы включены в фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток, чтобы помочь поддерживать стабильность белка. Следовательно, фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержит конкретные соотношения стабилизатора и белка. В некоторых вариантах реализации соотношение стабилизатора к белку составляет от около 0,22:1 до около 6,6:1 по массе. Различные варианты реализации включают соотношение стабилизатора к белку, выбранное из 0,44:1, 0,65:1, 0,87:1, 1,1:1 и 1,3:1, все по массе.

[00026] Фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток является хранимым. В некоторых вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в закрытом пузырьке. Средством укупоривания может быть пробка. В других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в цилиндре шприца. В еще других вариантах реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток содержится в одной камере двухкамерного автоинжектора.

[00027] В одном варианте реализации фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток получают путем объединения белка, буфера, неионогенного поверхностно-активного вещества и одного или нескольких стабилизаторов в воде с получением предварительно лиофилизированного водного раствора. Затем раствор сушат сублимацией с получением остатка, содержащего не более 10% и не менее 0,5% влаги. Высушенный сублимацией (лиофилизированный) белок находится в «твердом состоянии». В конкретном варианте реализации белок представляет собой

терапевтическое рекомбинантное человеческое или гуманизированное моноклональное антитело.

[00028] Согласно другому аспекту предложен способ получения композиции, содержащей терапевтический белок и не более 10% воды и не менее 0,5% воды.

[00029] В одном варианте реализации способ включает стадии получения водного образца, содержащего белок и наполнитель, в контейнере. Контейнер может представлять собой, помимо прочего, пузырек, цилиндр шприца или камеру двухкамерного автоинжектора. Контейнер достаточно открыт, чтобы позволить выделение водяного пара. Контейнер, содержащий водный образец, помещают в камеру; тепло отводится от образца до достижения первой температуры, при которой в образце образуются ледяные кристаллы. Воздух удаляют из камеры для достижения первого давления. Затем к образцу добавляют тепловую энергию для достижения второй температуры, позволяющей удалять воду из образца сублимацией. Остаточная вода может оставаться захваченной в образце после сублимации, что требует дополнительной второй стадии сушки. Эта вторая стадия сушки осуществляется путем прикладывания тепловой энергии к образцу при поддержании первого давления в камере, тем самым достигая третьей температуры. При этой температуре вода десорбируется из образца до достижения уровня влажности не более 10% и не менее 0,5%.

[00030] В одном варианте реализации во время начальной стадии сублимации и первичной сушки тепло отводится из водного образца со скоростью около 0,5°C в минуту. В одном варианте реализации первая температура составляет около -45°C. В другом варианте реализации первая температура поддерживается в течение около 60 минут. В еще одном варианте реализации водный образец выдерживают при 5°C в течение около 30 минут до достижения первой температуры.

[00031] В одном варианте реализации стадия первичной сушки проводится при второй температуре около -25°C. В одном варианте реализации вторая температура достигается путем увеличения температуры полки со скоростью около 0,5°C в минуту. В одном

варианте реализации вторая температура поддерживается в течение около 50 часов. В одном варианте реализации давление в камере во время первичной сушки составляет около 100 мТорр.

[00032] В одном варианте реализации стадию вторичной сушки проводят при третьей температуре около 35°C. В одном варианте реализации скорость изменения составляет около 0,3°C в минуту. В одном варианте реализации образец выдерживают при третьей температуре в течение около 6 часов.

[00033] После вторичной сушки в одном варианте реализации пузырек закупоривают при давлении в камере около 608000 мТорр. В одном варианте реализации камера заполняется газообразным N<sub>2</sub> до закупоривания. В одном варианте реализации пузырек закупоривают бутылкаучуковой пробкой для лиофилизации 4432/50 с покрытием Flurotec®.

[00034] В одном варианте реализации высушенный образец отжигают для релаксации белка в более низкое энергетическое состояние и улучшения его общей стабильности. Для отжига образца, к образцу прикладывается тепловая энергия для достижения четвертой температуры. В некоторых вариантах реализации образец выдерживают при четвертой температуре в течение по меньшей мере около 24 часов по меньшей мере, около 48 часов или, по меньшей мере около 60 часов для достижения оптимальной эффективной релаксации (альфа- и бета-релаксации) белка. Как только белок достигнет оптимального состояния релаксации, контейнер закрывается.

[00035] В одном варианте реализации четвертая температура, то есть, температура отжига, ниже температуры стеклования образца после стадии десорбции воды. В конкретном варианте реализации температура отжига составляет около 70°C. В другом конкретном варианте реализации температура отжига составляет около 45°C. В одном варианте реализации образец выдерживают при температуре отжига в течение около 72 часов. Поскольку разные белки имеют разные биофизические характеристики, в некоторых вариантах реализации четвертая температура определяется с помощью модулированной дифференциальной сканирующей калориметрии

(МДСК). В данном документе, в калориметр загружают образец композиции с лиофилизированным белком, который прошел стадию вторичной сушки. Затем образец подвергают инкрементному нагреву через стеклование, в то время как контролируется тепловой поток.  $T_g$  определяется. Затем образцы выдерживают при различных температурах ниже  $T_g$  в течение разного времени, чтобы вызвать энтальпийную релаксацию молекул в лиофилизированном остатке. Затем «релаксированные» образцы подвергают ДСК или МДСК и определяют площадь пика (теплоемкость в зависимости от температуры) вследствие энтальпийного восстановления (см. Luthra *et al.*, «Effects of annealing on enthalpy relaxation in lyophilized disaccharide formulations: mathematical modeling of DSC curves», 97(8) J Pharm Sci. 3084-99, 2008 г. и L. Thomas, «Modulated DSC® Paper #5: Measurement of Glass Transitions and Enthalpy Recovery», публикация TA Instruments TP 010, New Castle DE, доступная для загрузки во всемирной паутине по адресу [tainstruments.com](http://tainstruments.com) (по состоянию на 13 мая 2016 г.). Те суб- $T_g$  температуры и время которые обеспечивают оптимальную энтальпийную релаксацию, выбираются для четвертой (или температура отжига) температуры и времени. См. Также W.Q., «Calorimetric analysis of cryopreservation and freeze-drying formulations», 1257 Methods Mol. Biol. 163-79 (2015).

[00036] В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор (*т.е.* водный образец; он же водный раствор) содержит несколько наполнителей, таких как один или несколько стабилизаторов, один или несколько буферов и, необязательно, одно или несколько поверхностно-активных веществ.

[00037] В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор, а также восстановленная лиофилизированная жидкая композиция имеет рН, которая помогает поддерживать структуру и функцию белка. В конкретных вариантах реализации жидкие предварительно лиофилизированные и впоследствии восстановленные жидкие композиции имеют рН около  $6,0 \pm 2$ . Молекулы, которые буферизуют при рН около 6, считаются используемыми в этом варианте реализации. Таким образом, в одном

варианте реализации буфер содержит гистидин. В конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 10 мМ гистидина.

[00038] В одном варианте реализации предварительно лиофилизированный водный раствор содержит по меньшей мере один стабилизатор. В некоторых вариантах реализации стабилизатор или комбинация стабилизаторов включает один или несколько из трегалозы, сорбитола, глицерина, аргинина, аланина, маннитола, сахарозы, пролина, NaCl и глицина.

[00039] В одном варианте реализации стабилизатор или комбинация стабилизаторов включает сахарозу. В конкретном варианте реализации стабилизатор содержит сахарозу в концентрации около 10% (вес/объем) в водном растворе. В одном случае сахароза является единственным стабилизатором. В другом случае водный раствор содержит в качестве стабилизатора около  $3\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) аргинина в дополнение к 10% сахарозы (вес/объем).

[00040] В других вариантах реализации стабилизатор содержит сахарозу и по меньшей мере один другой молекулярный объект. В некоторых вариантах реализации водный раствор содержит около 5% сахарозы и один другой стабилизатор. В одном конкретном варианте реализации водный раствор содержит 5% сахарозы и любой из (a) около  $1,3\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) аланина, (b) около  $1,5\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) аргинина, (c) около  $1,34\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) глицерина, (d) около  $2,66\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) маннитола и (e) около  $2,66\% \pm 0,1\%$  (вес/объем) сорбитола.

[00041] В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит сахарозу и аргинин в различных концентрациях и пропорциях. В конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 7,5% сахарозы и  $2,3\% \pm 0,1\%$  аргинина. В другом конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 12,5% сахарозы и  $3,9\% \pm 0,1\%$  аргинина. В еще одном конкретном варианте реализации водный раствор содержит около 15% сахарозы и  $4,6\% \pm 0,1\%$  аргинина.

[00042] В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит трегалозу либо в качестве единственного стабилизатора, либо в комбинации с другим стабилизатором. В одном варианте реализации стабилизатор содержит трегалозу в концентрации около 10% (вес/объем) в водном растворе. В другом варианте реализации водный раствор содержит около 9,09% (вес/объем) трегалозы и любой из 0,48% (вес/объем) сорбитола, 0,24% (вес/объем) глицерина, 0,28% (вес/объем) аргинина и 0,24% (вес/объем) аланина. В другом варианте реализации водный раствор содержит 8,33% (вес/объем) трегалозы и любой из 0,89% (вес/объем) сорбитола, 0,45% (вес/объем) глицерина, 0,51% (вес/объем) аргинина и 0,43% (вес/объем) аланина. В другом варианте реализации водный образец содержит 6,66% (вес/объем) трегалозы и любой из 1,77% (вес/объем) сорбитола, 0,9% (вес/объем) глицерина, 1,03% (вес/объем) аргинина и 0,87% (вес/объем) аланина. В другом варианте реализации водный образец содержит 5% (вес/объем) трегалозы и любой из 2,66% (вес/объем) сорбитола, 1,34% (вес/объем) глицерина, 1,54% (вес/объем) аргинина и 1,3% (вес/объем) аланина.

[00043] Терапевтическим белком этого процесса может быть любой терапевтический белок, включая более мелкие пептиды, а также более крупные белки. В одном варианте реализации терапевтический белок изобретения составляет более 100 килодальтон или около 150 килодальтон или более. Терапевтический белок, включенный в данное изобретение, может представлять собой выделенный эндогенный белок, гетерологически экспрессированный белок и/или рекомбинантный белок, такой как химерный белок слияния или вариант эндогенного полипептида. В одном варианте реализации терапевтический белок представляет собой антигенсвязывающий белок. Антигенсвязывающие белки охватывают любой белок, который связывается с другим молекулярным объектом. Например, антигенсвязывающие белки включают антитела, биспецифичные антитела, фрагменты антител, слитые белки ScFv, белки, содержащие область определения комплементарности (CDR), лиганды, рецепторы, фрагменты лигандов, фрагменты рецепторов,

слитые белки, содержащие лигандные и/или рецепторные домены и рецепторные Fc-слитые белки, включая молекулы-ловушки.

[00044] В одном варианте реализации терапевтический белок представляет собой антитело. В конкретном варианте реализации терапевтическое антитело представляет собой моноклональное антитело. В более конкретном варианте реализации терапевтический белок представляет собой рекомбинантное человеческое или гуманизированное антитело, продуцируемое в гетерологичной клеточной линии. В другом варианте реализации терапевтический белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок. В другом более конкретном варианте реализации терапевтический белок представляет собой молекулу-ловушку, такую как молекула афлиберцепта (ловушка VEGF) или молекула рилонацепта (ловушка IL-1).

[00045] В некоторых вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является низкой, что включает диапазон концентраций, больший, чем ноль (то есть, низкий или меньший, чем 1 мкг/мл), и меньший или равный 25 мг/мл. В одном варианте реализации с низкой концентрацией, концентрация антитела составляет около 2 мг/мл.

[00046] В других вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является средней, что включает диапазон концентраций, превышающий 25 мг/мл и меньший или равный 100 мг/мл. В одном варианте реализации со средней концентрацией, концентрация антитела составляет около 50 мг/мл.

[00047] В других вариантах реализации концентрация антител в водном растворе является высокой, что включает диапазон концентраций, превышающий 100 мг/мл и меньший или равный 200 мг/мл. В одном варианте реализации с высокой концентрацией, концентрация антитела составляет около 150 мг/мл.

[00048] В других вариантах реализации концентрация антитела в водном растворе является сверхвысокой, что включает диапазон концентрации антитела, превышающий 200 мг/мл. В одном варианте реализации с сверхвысокой концентрацией, концентрация антитела составляет около 205 мг/мл.

[00049] Как отмечено выше, но без ограничения каким-либо механизмом действия, вода может служить пластификатором для лиофилизированного продукта, что неожиданно улучшает стабильность белка. Таким образом, в одном варианте реализации содержание влаги в полученной композиции (то есть стабильной лиофилизированной композиции) составляет  $\geq 2\%$  и  $\leq 10\%$  по массе. В другом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет  $\geq 3\%$  и  $\leq 6\%$  по массе. В другом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет  $\geq 4\%$  и  $\leq 6\%$  по массе. В одном специфическом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 6%. В другом специфическом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 4,5%. В еще одном специфическом варианте реализации содержание влаги в фармацевтически приемлемом лиофилизированном остатке составляет около 3%.

[00050] В одном варианте реализации лиофилизированный белок стабилен в течение по меньшей мере 24 месяцев при комнатной температуре. В конкретном варианте реализации  $\leq$  около 2% фармацевтически приемлемого лиофилизированного остатка деградирует после 24 месяцев хранения при 25°C. Не ограничиваясь каким-либо механизмом, деградация может включать протеолиз, химическую модификацию, агрегацию и тому подобное. Агрегация является распространенной формой деградации антител и наблюдается при образовании высокомолекулярных (HMW) частиц. Деградация может быть определена с использованием любого анализа белка, известного в данной области техники или еще не изобретенного. В специфическом варианте реализации деградацию антитела определяют путем измерения изменения в процентах высокомолекулярных (HMW) частиц с помощью эксклюзионной (SE) хроматографии.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00051] На Фиг. 1 и 2 представлены гистограммы, изображающие влияние температуры и влажности на стабильность

белка с течением времени. Ось X показывает время в месяцах и температуру. Ось Y показывает процентное изменение количества видов высокомолекулярного белка. Для каждой температуры отдельные гистограммы представляют увеличение процентного содержания воды (вес/вес) слева направо вдоль оси X, 0% воды (незакрашенные столбцы), 0,5% воды (светлые столбцы), 1,5% воды (нисходящий заштрихованные заполненные столбцы), 3,0% воды (вертикальные заполненные столбцы), 4,5% воды (горизонтальные заполненные столбцы), 6% воды (открытые ромбовидные столбики), 8% воды (клетчатые столбики) и 10% воды (темные штриховые столбики).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00052] Перед ознакомлением с описанием данного изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что употребляемая в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

[00053] Абсолютные количества и относительные количества наполнителей, ингредиентов и других материалов могут быть описаны по массе или в молях. Единицы массы могут быть выражены в граммах, миллиграммах, микрограммах и т.п.). Термин «вес», такой как «вес/объем», означает «массу». Относительные количества могут быть выражены в процентах по весу (то есть, в процентах по массе), где один (1) процент массы к объему (вес/объем) означает 1 грамм материала на 100 миллилитров объема. Также, например, один (1) компонент ингредиента «А» на один (1) компонент ингредиента «В» по весу означает, например, что на каждый (1) грамм ингредиента «А» приходится один (1) грамм ингредиента «В». Также, например, один процент (1%) по массе ингредиента «А» означает, например, что на каждые 100 грамм общей массы частицы приходится один (1) грамм ингредиента «А». Относительные количества ингредиента также могут быть

выражены в значениях моль или количество молекул на данный объем, например, миллимоль на литр (миллимоль (мМ)), или на другой ингредиент, например, X-компонент «А» на Y-компонент «В» в моль означает, что на каждые X моль «А» есть Y моль «В»

[00054] Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть применены на практике или при испытании данного изобретения, в настоящий момент описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки для полного описания.

### **Наполнители**

[00055] Наполнитель представляет собой ингредиент, добавляемый вместе с активным лекарственным веществом в фармацевтическую композицию. Наполнители помогают стабилизировать лекарственное вещество и/или увеличивать объем композиции. Термин ингредиент используется взаимозаменяемо с наполнителями.

[00056] Наполнители включают различные вещества для различных целей, таких как буферирование, набухание, растворение, стабилизация, пластификация и защита лекарственного вещества. Защитные средства защищают от теплового стресса и/или физического стресса, такого как стресс, вызываемый перемешиванием. Буферы хорошо известны в данной области.

[00057] Обычно, в водный раствор белка перед лиофилизацией включается буфер для стабилизации белка перед лиофилизацией и после восстановления. Буфер может быть включен в раствор для лиофилизации в концентрации от 1 мМ до 100 мМ. В некоторых конкретных вариантах реализации буфер включен в раствор для лиофилизации при около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации буфер присутствует в растворе для лиофилизации в концентрации от 5 мМ±0,75 мМ до 15 мМ±2,25 мМ; от 6 мМ±0,9 мМ до 14 мМ±2,1 мМ; от 7 мМ±1,05 мМ до 13 мМ±1,95 мМ; от 8 мМ±1,2 до 12 мМ±1,8 мМ; от 9 мМ±1,35 мМ до 11 мМ±1,65 мМ; 10 мМ±1,5 мМ; или около 10 мМ. В некоторых вариантах реализации буферная система раствора для

лиофилизации содержит гистидин, фосфат и/или ацетат при  $10 \text{ mM} \pm 1,5 \text{ mM}$ .

[00058] В некоторых вариантах реализации буфер выбран из химического вещества, способного буферизоваться где-то в диапазоне рН от около 3 до около 9 или в диапазоне рН от около 3,7 до около 8,0. Например, предварительно лиофилизированный раствор может иметь рН около 3,4, около 3,6, около 3,8, около 4,0, около 4,2, около 4,4, около 4,6, около 4,8, около 5,0, около 5,2, около 5,4, около 5,6, около 5,8, около 6,0, около 6,2, около 6,4, около 6,6, около 6,8, около 7,0, около 7,2, около 7,4, около 7,6, около 7,8 или около 8,0.

[00059] Буфер может представлять собой комбинацию отдельных буферов, такую как, *например*, комбинация гистидина и ацетата (гис-ацетатный буфер). В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 3,5 до около 6 или от около 3,7 до около 5,6, такой как диапазон, забуференный ацетатом. В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 5,5 до около 8,5 или от около 5,8 до около 8,0, такой как диапазон, забуференный фосфатом. В одном варианте реализации буфер имеет диапазон буферизации от около 5,0 до около 8,0 или от около 5,5 до около 7,4, такой как диапазон, забуференный гистидином.

[00060] Наполнители включают стабилизаторы. Используемый в данном документе стабилизатор добавляют к раствору для лиофилизации, чтобы стабилизировать белок от агрегации или другой деградации. Стабилизация может происходить путем контроля динамики стеклования в процессе лиофилизации или путем сохранения естественной структуры белка путем специфического взаимодействия стабилизатора с белком. Для обсуждения биофизики стабилизаторов во время лиофилизации, см. Chang et al., «Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?» 94(7) J. Pharm. Sci. 1427-44 (2005).

[00061] Стабилизаторы для включения в раствор для лиофилизации включают полиолы, сахара, соли (например, хлорид натрия), аминокислоты и тому подобное. Различные индивидуальные стабилизаторы могут использоваться отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими стабилизаторами для оптимального стабилизирующего эффекта. Например, полиол может быть объединен с сахаром, сахар с аминокислотой, полиол с аминокислотой, соль с сахаром, соль с аминокислотой, соль с полиолом и тому подобное.

[00062] Полиолы представляют собой органические молекулы с более чем одной гидроксильной группой (-OH). Полиолы включают мономеры, а также полимеры. Сахарные спирты представляют собой подгруппу полиольных сахарных спиртов, которые могут служить полезными стабилизаторами, включают маннитол, ксилитол, сорбитол, изомальто́л, эритритол, мальтитол и глицерин. Другие мономерные полиолы включают этиленгликоль, пропиленгликоль и пентаэритритол. Полимерные полиолы могут быть сложными полиэфирами или простыми полиэфирами субъединиц полиола. Используемые для примера полимерные полиолы включают полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и поли(тетраметиленовый эфир) гликоль.

[00063] Сахара используются в качестве стабилизаторов (а также в качестве наполнителей). Сахара можно отнести к категории восстанавливающих или невосстанавливающих сахаров. Невосстанавливающие сахара включают дисахариды сахарозу и трегалозу. Восстанавливающие сахара включают глюкозу, мальтозу и лактозу. Как правило, невосстанавливающие сахара являются предпочтительными для лиофилизации белка, поскольку восстанавливающие сахара могут восстанавливать белки посредством реакции Майяра. См. в целом Lavakumar *et al.*, «Lyophilization/Freeze Drying - A Review," 3(4) *Int. J. Novel Trends in Pharm. Sci.* 2277-2782 (2013). Дисахариды трегалоза и сахароза относительно инертны и имеют тенденцию образовывать аморфное стекло во время лиофилизации. Трегалоза или сахароза, отдельно или в комбинации с аминокислотой или полиолом,

используются в качестве стабилизатора в практике данного изобретения.

[00064] В одном варианте реализации трегалоза используется в качестве единственного стабилизатора. В других вариантах реализации трегалоза комбинируется с полиолом. В некоторых вариантах реализации стабилизатор представляет собой комбинацию трегалозы и сорбитола или трегалозы и глицерина. В других вариантах осуществления трегалоза комбинируется с аминокислотой. В частности, трегалоза комбинируется с аланином, или трегалоза комбинируется с аргинином.

[00065] В другом варианте реализации сахароза используется в качестве единственного стабилизатора. В других вариантах реализации сахароза комбинируется с полиолом. В специфических вариантах реализации стабилизатор представляет собой комбинацию сахарозы и маннитола, сахарозы и сорбитола или сахарозы и глицерина. В других вариантах реализации сахароза комбинируется с аминокислотой. В частности, сахароза комбинируется с аргинином или сахароза комбинируется с аланином.

[00066] Аминокислоты используются в качестве стабилизаторов. Глицин является обычно используемым наполнителем и стабилизатором. Другие используемые аминокислоты включают аргинин, аланин и пролин. В некоторых вариантах реализации аргинин используется в качестве стабилизатора. В некоторых специфических вариантах реализации аргинин комбинируется с сахарозой или аргинин комбинируется с трегалозой. В других вариантах реализации аланин используется в качестве стабилизатора. В некоторых специфических вариантах реализации аланин комбинируется с сахарозой или аланин комбинируется с трегалозой.

[00067] В некоторых случаях одно или несколько поверхностно-активных веществ могут использоваться в качестве наполнителя. Предполагается, что поверхностно-активные вещества обеспечивают дополнительную стабильность за счет снижения гидрофобного взаимодействия белок-белок и, как результат, образования высокомолекулярных частиц (т.е. агрегатов). В некоторых вариантах реализации одно или несколько поверхностно-

активных веществ могут быть включены в предварительно лиофилизированный содержащий белок водный раствор. В других вариантах реализации одно или несколько поверхностно-активных веществ могут быть включены в раствор разбавителя для разведения. Поверхностно-активные вещества включают вещества, которые уменьшают поверхностное натяжение жидкости, в которой она растворена и/или уменьшают межфазное натяжение между маслом и водой. Поверхностно-активные вещества могут быть ионными или неионными. Типичные неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в предварительно лиофилизированный раствор или в раствор после восстановления, включают, *например*, алкилполи(этиленоксид), алкилполиглюкозиды (*например*, октилглюкозид и децилмальтозид), жирные спирты, такие как цетиловый спирт и олеиловый спирт, кокамид MEA, кокамид DEA и кокамид TEA. Специфические неионные поверхностно-активные вещества, которые могут быть включены в предварительно лиофилизированный водный раствор (или впоследствии восстановленный раствор), включают, *например*, сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана (или полисорбаты), такие как полисорбат 20, полисорбат 28, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 65, полисорбат 80, полисорбат 81 и полисорбат 85; полуксамеры, такие как полуксамер 188, полуксамер 407; полиэтилен-полипропиленгликоль; или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Полисорбат 20 также известен как TWEEN 20, сорбитанмонолаурат и полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат. Полисорбат 80 также известен как TWEEN 80, сорбитанмоноолеат и полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат.

[00068] Количество поверхностно-активного вещества, содержащегося в растворе для предварительной лиофилизации или растворе для восстановления, может варьироваться в зависимости от специфических свойств и целей, желательных для лиофилизированной композиции. В некоторых вариантах реализации раствор для предварительной лиофилизации или раствор для восстановления может содержать от около 0,001% (вес/объем) до около 0,5% (вес/объем) поверхностно-активного вещества (*например*, полисорбат 20 или полисорбат 80). Например, раствор

для предварительной лиофилизации может содержать около 0,001%; около 0,0015%; около 0,002%; около 0,0025%; около 0,003%; около 0,0035%; около 0,004%; около 0,0045%; около 0,005%; около 0,0055%; около 0,006%; около 0,0065%; около 0,007%; около 0,0075%; около 0,008%; около 0,0085%; около 0,009%; около 0,0095%; около 0,01%; около 0,015%; около 0,016%; около 0,017%; около 0,018%; около 0,019%; около 0,02%; около 0,021%; около 0,022%; около 0,023%; около 0,024%; около 0,025%; около 0,026%; около 0,027%; около 0,028%; около 0,029%; около 0,03%; около 0,031%; около 0,032%; около 0,033%; около 0,034%; около 0,035%; около 0,036%; около 0,037%; около 0,038%; около 0,039%; около 0,04%; около 0,041%; около 0,042%; около 0,043%; около 0,044%; около 0,045%; около 0,046%; около 0,047%; около 0,048%; около 0,049%; около 0,05%; около 0,051%; около 0,052%; около 0,053%; около 0,054%; около 0,055%; около 0,056%; около 0,057%; около 0,058%; около 0,059%; около 0,06%; около 0,061%; около 0,062%; около 0,063%; около 0,064%; около 0,065%; около 0,066%; около 0,067%; около 0,068%; около 0,069%; около 0,07%; около 0,071%; около 0,072%; около 0,073%; около 0,074%; около 0,075%; около 0,076%; около 0,077%; около 0,078%; около 0,079%; около 0,08%; около 0,081%; около 0,082%; около 0,083%; около 0,084%; около 0,085%; около 0,086%; около 0,087%; около 0,088%; около 0,089%; около 0,09%; около 0,091%; около 0,092%; около 0,093%; около 0,094%; около 0,095%; около 0,096%; около 0,097%; около 0,098%; около 0,099%; около 0,10%; около 0,15%; около 0,20%; около 0,25%; около 0,30%; около 0,35%; около 0,40%; около 0,45%; или около 0,50% поверхностно-активного вещества (например, полисорбат 20 или полисорбат 80).

[00069] Один или несколько пластификаторов включены в композицию лиофилизованного белка. Пластификаторы обычно используются для увеличения текучести или гибкости системы. Считается, что повышенная текучесть является результатом того, что пластификатор увеличивает свободный объем системы и снижает температуру стеклования. Добавление пластификаторов модифицирует как альфа-релаксацию, так и бета-релаксацию в лиофилизованном остатке. Альфа-релаксация также известна как первичная или

стеклянная релаксация и является глобальным процессом релаксации. Бета-релаксация это более локальный процесс, связанный с движением цепи белкового полимера, который может быть лучше модифицирован меньшими молекулами (т.е. пластификаторами). Оба процесса релаксации уменьшают общую энергию системы и, как полагают, особенно в случае бета-релаксации, влияют на стабильность белка. В области биофизики белка общеизвестно, что пластификаторы уменьшают время бета-релаксации и могут одновременно снижать стабильность белка (см., например, Cicerone and Douglas, " $\beta$ -Relaxation governs protein stability in sugar-glass matrices," *Soft Matter* 8: 2983-2991, 2012).

[00070] Изобретение также относится к одному из вариантов реализации лиофилизированных белковых композиций, содержащих один или несколько сахаров в комбинации с одним или несколькими пластификаторами в определенном соотношении для создания «стабилизатора», который обеспечивает достаточную гибкость и альфа-релаксацию остатка, сохраняя или повышая стабильность белка. В некоторых вариантах реализации стабилизатор содержит весовое соотношение сахара к пластификатору (т.е. массы к массе) от около 19:1 до около 1:1. В некоторых вариантах реализации стабилизатор включает весовое соотношение сахара к пластификатору около 19:1, около 18:1, около 17:1, около 16:1, около 15:1, около 14:1, около 13:1, около 12:1, около 11:1, около 10:1, около 9:1, около 8:1, около 7:1, около 6:1, около 5:1, около 4:1, около 3:1, около 2:1 или около 1:1.

[00071] Подходящие пластификаторы включают полиолы, такие как сорбитол, глицерол (глицерин), маннитол и ксилитол, аминокислоты, такие как глицин, аргинин, пролин и аланин, и соли, такие как NaCl. Интересно, что вода также может выполнять функцию пластификатора. Тем не менее, вода, как правило, не одобряется, потому что она является одновременно химическим реагентом и пластификатором, что приводит к увеличению подвижности и снижению  $T_g$ . Повышенная подвижность коррелирует с повышенной реакционной способностью и гидролизом внутри системы.

Повышенная реакционная способность и гидролиз разрушают стабильность белка. См. Terakita et al., "The Influence of Water on the Stability of Lyophilized Formulations with Inositol and Mannitol as Excipients", 57(5) Chem. Pharm. Bull. 459-463 (2009).

[00072] Как описано выше, маннитол, глицерин, сорбитол и глицин в комбинации с водой используются в некоторых вариантах реализации в качестве пластификатора. Не будучи связанными теорией, считается, что эти молекулы в конкретных вариантах реализации композиции уменьшают время бета-релаксации, а также увеличивают стабильность белка.

[00073] В некоторых специфических вариантах реализации сахарную сахарозу или трегалозу комбинируют с пластификатором сорбитолом в массовом соотношении около 4:1, около 3,9:1, около 3,8:1, около 3,7:1, около 3,6:1, около 3,5:1, около 3,4:1, около 3,3:1, около 3,2:1, около 3,1:1, около 3:1, около 2,9:1, около 2,8:1, около 2,7:1, около 2,6:1, около 2,5:1, около 2,4:1, около 2,3:1, около 2,2:1, около 2,1:1, около 2:1, около 2:1, около 1,9:1, около 1,8:1, около 1,7:1, около 1,6:1, около 1,5:1, около 1,4:1, около 1,3:1, около 1,2:1, около 1,1:1 или около 1:1. В других специфических вариантах реализации, сахар сахароза или трегалоза объединяют с пластификатором аргинином в массовом соотношении около 33:1, около 32:1, около 31:1, около 30:1, около 29:1, около 28:1, около 27:1, около 26:1, около 25:1, около 24:1, около 23:1, около 22:1, около 21:1, около 20:1, около 19:1, около 18:1, около 17:1, около 16:1, около 15:1, около 14:1, около 13:1, около 12:1, около 11:1, около 10:1, около 9:1, около 8:1, около 7:1, около 6:1, около 5:1, около 4,5:1, около 4:1, около 3,5:1 или около 3:1.

[00074] Изобретение также обеспечивает аспект, что вода служит стабилизирующим пластификатором в лиофилизированной композиции и помогает снизить скорость агрегации белка в лиофилизированных композициях, хранящихся при комнатной температуре. Количество влаги, необходимое для эффективной стабилизации белка в лиофилизированном остатке при комнатной температуре, увеличивается с увеличением содержания белка и

уменьшается с уменьшением содержания белка. Таким образом, лиофилизированная композиция, полученная из предварительно лиофилизированного раствора, содержащего 50 мг/мл белка, может требовать более низкого содержания влаги, чем лиофилизированная композиция, полученная из предварительно лиофилизированного раствора, содержащего 150 мг/мл белка. Кроме того, оптимальное количество влаги, необходимое для эффективной стабилизации белка в лиофилизированном остатке, изменяется в зависимости от температуры хранения. Например, промежуточное количество влаги используемое для длительного хранения белка лиофилизата при комнатной температуре. При более высоких температурах хранения (например, 37°C) требуется меньше влаги.

[00075] Например, на Фиг.1 показано влияние влаги на стабильность типичной композиции для лиофилизации антител, хранящейся при 25, 37 или 50°C. В данном документе предварительно лиофилизированная композиция содержит 150 мг/мл IgG, 5% сахарозы и 1,54% аргинина. Конечный лиофилизированный остаток содержал влагу (вес/вес) в количестве 0%, 0,5%, 1,5%, 3,0%, 4,5%, 6%, 8% или 10%. Как показано на Фиг. 1, более высокая температура хранения привела к снижению стабильности белка в течение 2-3 месяцев. Интересно, что оптимальное количество влаги для обеспечения максимальной стабильности было выше при комнатной температуре, чем при 37 или 50°C. В этом конкретном примере оптимальное содержание влаги для стабильности белка при комнатной температуре составляло около 4,5% (вес/вес) и от около 1,5% до около 3% при хранении при 50°C в течение 2 месяцев. Более долгосрочные данные о стабильности проиллюстрированы на Фиг. 2, которая показывает примерную композицию для лиофилизации антител, хранящуюся при 25 и 37°C в течение 12 и 6 месяцев соответственно. Как показано на Фиг. 2, содержание влаги от 3,0% до 4,5% (вес/вес) обеспечивает лучшую стабильность при обеих испытанных температурах и содержание влаги 4,5% обеспечивает наибольшую стабильность через 12 месяцев при комнатной температуре (25°C).

[00076] В одном варианте реализации изобретение предлагает композицию стабильного лиофилизированного белка (например, антитело), содержащую от 1,5% до 8% воды (вес/вес), которая остается стабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре (25°C), где стабильность относится к менее чем 2% увеличению высокомолекулярных видов в течение 12-месячного периода хранения. В другом варианте реализации изобретение обеспечивает композицию стабильного лиофилизированного белка (например, антитело), содержащую от 3,0% до 4,5% воды (вес/вес), которая остается стабильной в течение по меньшей мере 12 месяцев при комнатной температуре (25°C), где стабильность относится к менее чем 1,5% увеличению высокомолекулярных видов в течение 12-месячного периода хранения.

[00077] В некоторых вариантах реализации лиофилизированная композиция содержит  $\geq 0,5\%$  воды по весу,  $\geq 0,6\%$  воды по весу,  $\geq 0,7\%$  воды по весу,  $\geq 0,8\%$  воды по весу,  $\geq 0,9\%$  воды по весу,  $\geq 1\%$  воды по весу,  $\geq 1,5\%$  воды по весу,  $\geq 2\%$  воды по весу,  $\geq 2,5\%$  воды по весу,  $\geq 3\%$  воды по весу,  $\geq 3,5\%$  воды по весу,  $\geq 4\%$  воды по весу,  $\geq 4,5\%$  воды по весу,  $\geq 5\%$  воды по весу,  $\geq 5,5\%$  воды по весу,  $\geq 6\%$  воды по весу,  $\geq 6,5\%$  воды по весу,  $\geq 7\%$  воды по весу,  $\geq 7,5\%$  воды по весу,  $\geq 8\%$  воды по весу,  $\geq 8,5\%$  воды по весу,  $\geq 9\%$  воды по весу или  $\geq 9,5\%$  воды по весу, но не более 10% воды по весу. Однако экстраоптимальное количество воды может увеличить нестабильность белка. Таким образом, в некоторых вариантах реализации лиофилизированная композиция содержит  $\leq 10\%$  воды по весу,  $\leq 9,5\%$  воды по весу,  $\leq 9\%$  воды по весу,  $\leq 8,5\%$  воды по весу,  $\leq 8\%$  воды по весу,  $\leq 7,5\%$  воды по весу,  $\leq 7\%$  воды по весу,  $\leq 6,5\%$  воды по весу,  $\leq 6\%$  воды по весу,  $\leq 5,5\%$  воды по весу,  $\leq 5\%$  воды по весу,  $\leq 4,5\%$  воды по весу,  $\leq 4\%$  воды по весу,  $\leq 3,5\%$  воды по весу,  $\leq 3\%$  воды по весу,  $\leq 2,5\%$  воды по весу,  $\leq 2\%$  воды по весу,  $\leq 1,5\%$  воды по весу,  $\leq 1\%$  воды по весу,  $\leq 0,9\%$  воды по весу,  $\leq 0,8\%$  воды по весу,  $\leq 0,7\%$  воды по весу,  $\leq 0,6\%$  воды по весу, но не менее 0,5% воды по весу.

[00078] Фраза «содержание влаги» может использоваться взаимозаменяемо с «содержанием воды». Однако «содержание влаги» используется для описания содержания воды в лиофилизированном остатке, тогда как «содержание воды» используется для описания количества воды в водном растворе, геле, другой жидкости, газе, ледяной или твердой форме композиции, такой как лиофилизированный остаток, высушенные распылением частицы и тому подобное. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 0,5% до 10% по весу, от 1% до 10% по весу, от 2% до 10% по весу, от 3% до 10% по весу, от 4% до 10% по весу, от 5% до 10% по весу, от 6% до 10% по весу, от 7% до 10% по весу, от 8% до 10% по весу, от 9% до 10% по весу, от 0,5% до 9% по весу, от 0,5% до 8% по весу, от 0,5% до 7% по весу, от 0,5% до 6% по весу, от 0,5% до 5% по весу, от 0,5% до 4% по весу, от 0,5% до 3% по весу, от 0,5% до 2% по весу, от 0,5% до 1% по весу, от 1% до 2% по весу, от 1,5% до 2,5% по весу, от 2% до 3% по весу, от 2,5% до 3,5% по весу, от 3% до 4% по весу, от 3,5% до 4,5% по весу, от 4% до 5% по весу, от 4,5% до 5,5% по весу, от 5% до 6% по весу, от 5,5% до 6,5% по весу, от 6% до 7% по весу, от 6,5% до 7,5% по весу, от 7% до 8% по весу, от 7,5% до 8,5% по весу, от 8% до 9% по весу, от 8,5% до 9,5% по весу, от 9% до 10% по весу, от 9,5% до 10% по весу или около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% или 8% по весу. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 3% до 6% по весу; от 3,1% до 5,9% по весу, от 3,2% до 5,8% по весу, от 3,3% до 5,7% по весу, от 3,4% до 5,6% по весу, от 3,5% до 5,5% по весу, от 3,6% до 5,4% по весу, от 3,7% до 5,3% по весу, от 3,8% до 5,2% по весу, от 3,9% до 5,1% по весу, от 4% до 5% по весу, от 4,1% до 4,9% по весу, от 4,2% до 4,8% по весу, от 4,3% до 4,7% по весу, от 4,4% до 4,6% по весу или около 4,5% по весу. В некоторых вариантах реализации содержание влаги в лиофилизированной композиции составляет от 2% до 4% по весу; от 2,1% до 3,9% по весу, от 2,2% до 3,8% по весу, от 2,3% до 3,7% по весу, от 2,4% до 3,6% по весу, от 2,5% до 3,5% по весу, от

2,6% до 3,4% по весу, от 2,7% до 3,3% по весу, от 2,8% до 3,2% по весу, от 2,9% до 3,1% по весу или около 3% по весу.

[00079] В некоторых вариантах реализации массовое процентное содержание воды в лиофилизированном остатке составляет около 3%, около 3,1%, около 3,2%, около 3,3%, около 3,4%, около 3,5%, около 3,6%, около 3,7%, около 3,8%, около 3,9%, около 4%, около 4,1%, около 4,2%, около 4,3%, около 4,4%, около 4,5%, около 4,6%, около 4,7%, около 4,8%, около 4,9%, около 5%, около 5,1%, около 5,2%, около 5,3%, около 5,4%, около 5,5%, около 5,6%, около 5,7%, около 5,8%, около 5,9%, около 6%, около 6,1%, около 6,2%, около 6,3%, около 6,4%, около 6,5%, около 6,6%, около 6,7%, около 6,8%, около 6,9%, около 7%, около 7,1%, около 7,2%, около 7,3%, около 7,4%, около 7,5%, около 7,6%, около 7,7%, около 7,8%, около 7,9% или около 8%. В некоторых вариантах реализации содержание воды в лиофилизированном остатке составляет более 3%, но менее 10% по весу.

[00080] Содержание воды в лиофилизированном остатке может быть определено любым одним или несколькими методами, известными в данной области. Эти методы включают гравиметрические методы, включая термогравиметрию, газовую хроматографию, спектроскопию ближнего инфракрасного диапазона, кулонометрию и метод Карла-Фишера или метод датчика относительной влажности. Некоторые из этих методов рассматриваются в J. K. Townes, «Moisture content in proteins: its effects and measurement», 705 J. Chromatography A 115-127, 1995; и Malik et al., «Analytical Options for the Measurement of Residual Moisture Content in Lyophilized Biological Materials», Am. Pharma. Ред. 1 августа 2010 г.; и цитируемых в данных документах ссылок. Например, можно использовать метод потери при высушивании (LOD) (гравиметрический), в котором лиофилизированный остаток взвешивают, подвергают дополнительному нагреву для полного удаления всей воды и других летучих веществ и затем снова взвешивают. Потеря массы объясняется водой (и другими летучими веществами), содержащимися в исходном материале. Другим методом определения содержания воды является метод Карла-Фишера

(объемный или кулонометрический), который определяет количество  $H_2O$  путем измерения степени окисления  $SO_2$  с помощью  $I_2$ , где один моль  $I_2$  является потребителем на моль  $H_2O$ . Спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона измеряет коэффициент отражения от 1100 до 2500 нм через стеклянный пузырек (стеклянная поверхность), содержащий белок, для определения содержания влаги без разрушения образца. См. Фармакопея США, XXIII Revision, USP Convention, Rockville, MD 1995, pp. 1801-1802; и Savage et. al., "Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy", 26 Biologicals 119-124, 1998.

#### **Лиофилизированный остаток**

[00081] Лиофилизированная композиция, содержащая белок и стабилизатор, образует твердую матрицу, также известную как «остаток» или «лиофилизированный остаток». «Фармацевтически приемлемый остаток» (используется взаимозаменяемо или как «фармацевтически приемлемый лиофилизированный остаток») является аморфным (стеклообразным, а не кристаллическим) и имеет эстетически элегантный внешний вид. Фармацевтически приемлемый остаток не должен иметь усадку, растрескивание, частичное или полное разрушение, плавление или изменение цвета. Красный, черный, коричневый, желтый или другой окрашенный остаток обесцвечивается и является недопустимым. Идеальный остаток механически прочен и устойчив к разрушению при обработке, пористый и похожий на губку, имеет однородную текстуру и образует единое целое и равномерно белого цвета. Остаток должен быть равномерно прикреплен к стенкам пузырька и не показывать отслоение или другие признаки усадки. См. Carpenter et al., «Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice», *Pharmaceutical Research*, 14 (8): 969-975, 1997.

[00082] Остаток не должен иметь визуальных дефектов из-за проблем с замерзанием, включая трубкообразную структуру; сухую пену на верхней поверхности; корку или глазирование на поверхности остатка; и горизонтальное наслоение или формирование

кольца. Остаток также должен быть без видимых дефектов из-за проблем высушивания, включая усадку, когда объем остатка меньше, чем у замороженной матрицы, и признаки отслоения стенки очевидны; растрескивание, когда остаток показывает трещины в сухой матрице, и остаток не образует единого объекта; различные степени потери структуры остатка, такие как полное или частичное разрушение остатка; расплавление, где остаток содержит кольцо растворенного материала в нижней области; частичное расплавление, где только небольшая область в основании остатка содержит растворенный материал; и потемнение, которое является желтым или коричневым обесцвечиванием остатка из-за включения восстанавливающего сахара, который подвергся реакции Майяра. Расплавление является особенно проблематичным, поскольку оно может привести к замедлению времени растворения, агрегации белка, деградации и потере активности. См. FDA, "Guide to Inspections of Lyophilization of Parenterals (7/93). Finished product inspection. Last update 2009" 2009, последнее обращение 7/8/2016 по адресу <http://www.fda.gov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/ucm074909.htm>.

#### **Белковое лекарственное вещество**

[00083] Термин «белок» означает любой аминокислотный полимер, имеющий более чем около 50 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или несколько аминокислотных полимерных цепей, обычно известных в данной области как «полипептиды». Белок может содержать один или несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. «Полипептиды» обычно содержат более 50 аминокислот, тогда как «пептиды» обычно содержат 50 аминокислот или менее. Белки могут содержать одну или несколько ковалентных и нековалентных модификаций. Дисульфидные мостики (то есть между остатками цистеина с образованием цистина) могут присутствовать в некоторых белках. Эти ковалентные связи могут находиться внутри одной полипептидной цепи или между двумя отдельными полипептидными цепями. Например, дисульфидные мостики необходимы

для правильной структуры и функции инсулина, иммуноглобулинов, протамина и тому подобного. О недавнем обзоре образования дисульфидных связей см. Oka and Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).

[00084] В дополнение к образованию дисульфидной связи белки могут подвергаться другим посттрансляционным модификациям. Эти модификации включают липидирование (например, миристоилирование, пальмитоилирование, фарнезоилирование, геранилгеранилирование и образование якорей гликозилфосфатидилинозитола (GPI)), алкилирование (например, метилирование), ацилирование, амидирование, гликозилирование (например, присоединение гликозильных групп к аргинину, аспаргину, цистеину, гидроксизину, серину, треонину, тирозину и/или триптофану) и фосфорилирование (т.е. присоединение фосфатной группы к серину, треонину, тирозину и/или гистидину). Для недавнего обзора посттрансляционной модификации белков, продуцируемых у эукариот, см. Mowen and David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling", 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); и Blixt and Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)", 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).

[00085] Иммуноглобулины (или «антитела») являются примерами белков, имеющих множественные полипептидные цепи и обширные посттрансляционные модификации. Канонический белок иммуноглобулина (например, IgG) содержит четыре полипептидные цепи, две легкие цепи и две тяжелые цепи. Каждая легкая цепь связана с одной тяжелой цепью через цистиновую дисульфидную связь, и две тяжелые цепи связаны друг с другом через две цистиновые дисульфидные связи. Иммуноглобулины, продуцируемые в системах млекопитающих, также гликозилированы в различных остатках (например, в остатках аспарагина) различными полисахаридами и могут различаться у разных видов, что может влиять на антигенность терапевтических антител (см. Butler and Spearman, "The choice of mammalian cell host and possibilities

for glycosylation engineering", 30 Curr Opin Biotech 107-112 (2014)).

[00086] Используемый в данном документе термин «белок» включает терапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и Fc-слитые белки других рецепторов, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, антитела человека, биспецифические антитела, фрагменты антител, нанотела, рекомбинантные химерные антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и тому подобное. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования рекомбинантных клеток, таких как система бакуловируса насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Для недавнего обзора, обсуждающего терапевтические белки и их производство, см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012).

[00087] Некоторые рекомбинантные Fc-содержащие белки содержат рецепторы или фрагменты рецепторов, лиганды или фрагменты лигандов, которые имеют родственных партнеров по связыванию в биологических системах. «Рецепторные Fc-слитые белки» относятся к рекомбинантным молекулам, которые содержат растворимый рецептор, слитый с Fc-доменом иммуноглобулина. Некоторые Fc-слитые белки рецептора могут содержать лиганд-связывающие домены множества различных рецепторов. Эти рецепторные Fc-слитые белки известны как «ловушки» или «молекулы ловушки». Рилоноцепт и афлиберцепт являются примерами рыночных ловушек, которые противодействуют IL1R (см. патент США № 7,927,583) и VEGF (см. патент США № 7,087,411), соответственно. Другие рекомбинантные Fc-содержащие белки включают те рекомбинантные белки, которые содержат пептид, слитый с Fc-доменом, например технология Centocor MIMETIBODY™. Рекомбинантные Fc-содержащие белки описаны в С. Huang, "Receptor-

Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

[00088] «Fc-слитые белки» включают часть или все два или более белков, один из которых является частью Fc молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в своем естественном состоянии. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, риноалцепт, который содержит лигандную связывающую область IL-1RacP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6,927,004, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; например, SEQ ID NO:1; см. патенты США № 7,087,411 и 7,279,159, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылки).

[00089] В некоторых вариантах реализации белок включен в предварительно лиофилизированный водный раствор в концентрации более 40 мг/мл. В некоторых вариантах реализации предварительно лиофилизированный водный раствор содержит белок в концентрации от около 50 мг/мл до около 250 мг/мл; от около 100 мг/мл до около 200 мг/мл; от около 125 мг/мл до около 175 мг/мл. В некоторых вариантах реализации, предварительно лиофилизированный водный раствор содержит белок в концентрации от около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 75 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 95 мг/мл, около 100 мг/мл, около 105 мг/мл, около 110 мг/мл, около 115 мг/мл, около 120 мг/мл, около 125 мг/мл, около 130 мг/мл, около 135 мг/мл, около 140 мг/мл, около 145 мг/мл, около 150 мг/мл, около 155 мг/мл, около 160 мг/мл, около 165 мг/мл, около 170 мг/мл, около 175 мг/мл, около 180 мг/мл, около 185 мг/мл, около 190 мг/мл, около 195 мг/мл или около 200 мг/мл.

#### **Контейнеры**

[00090] В некоторых вариантах реализации предварительно лиофилизированный водный раствор, содержащий терапевтический

белок, содержится в контейнере. Процесс сублимационной сушки применяется к раствору в вентилируемом контейнере, который впоследствии закрывается для хранения лиофилизированной композиции. Термин «контейнер» применяется в данном документе очень широко. Контейнер, например, может представлять собой контейнер для сыпучих веществ, такой как бутылка, банка или канистра, вмещающая от 2 мл до четырех литров или более, ампула, пузырек (стеклянный или пластиковый), шприц (стеклянный или пластиковый), картридж или автоинжектор. Пузырек может быть размером не более 0,2 мл или не более 100 мл. Типичные пузырьки могут быть изготовлены из прозрачного или янтарного стекла, боросиликатного стекла типа I, содосиликатного стекла типа II или содосиликатного стекла типа III. Пузырек может быть закрыт пробкой, крышкой, откидной крышкой или винтовой крышкой. Трубочатое стекло в стиле SCHOTT® особенно полезно при лиофилизации.

[00091] С появлением биологических препаратов и самостоятельного введения пациентами инъекционных препаратов автоинжекторы стали более важным контейнером для лекарственного продукта. Самостоятельное введение лиофилизованного лекарственного продукта требует, чтобы пациент восстанавливал лиофилизированный остаток стерильной водой для инъекций или другим стерильным растворителем. Чтобы обеспечить стерильное восстановление, контроль объема, простоту обращения и общее упрощение, можно использовать предварительно заполненные шприцы с двумя или несколькими камерами. Двухкамерные автоинжекторы или другие предварительно заполненные шприцы содержат лиофилизированный лекарственный продукт в одной камере и предварительно отмеренное количество разбавителя или жидкой фармацевтической композиции в другой камере. Пример двухкамерных инжекторов образца описан в US 6,149,626 A, выданном 21 ноября 2006 г., и US 7,959,600 B2, выданном 14 июня 2011 г.

#### **Стабильность белка**

[00092] Лيوфилизированная форма белка обеспечивает несколько преимуществ, одним из которых является сохранение

стабильности белка с течением времени, особенно в течение по меньшей мере 18 месяцев при комнатной температуре. «Комнатная температура» относится к температуре обычной рабочей среды. Температура в помещении включает температуры в диапазоне 10–40°C, 17–27°C, 20–24°C, 25°C±3°C, 25°C±2°C, 25°C±1°C или около 25°C. Фраза «комнатная температура» может использоваться взаимозаменяемо с фразой «температура окружающей среды». Комнатная температура включает в себя «контролируемую комнатную температуру», которая указывает на температуру обычной рабочей среды от 20 до 25°C с кратковременными отклонениями (перепадами) от 15° до 30°, что может наблюдаться в аптеках, больницах и на складах. «Контролируемая комнатная температура» включает в себя расчетную среднюю кинетическую температуру не более 25° (см. *The Pharmacopeia of the United States of America, Thirty-Third Revision and the National Formulary, Twenty-Eighth Edition, USP 33-NF 28 Reissue, General Notices and Requirements, "Applying to Standards, Tests, Assays, and Other Specifications of the United States Pharmacopeia"*, 10.30 Storage Temperature and Humidity, May 1, 2010, available at [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/USP33-NF28-ReissueGeneralNotices.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/USP33-NF28-ReissueGeneralNotices.pdf), last accessed July 8, 2016).

[00093] Термин «стабильность» относится к сохранению приемлемой степени физической структуры (термодинамическая и коллоидная стабильность), химической структуры (кинетическая стабильность) или биологической функции (функциональная стабильность) белка после хранения в соответствующей среде или при определенных условиях. Белок может быть стабильным, даже если он не сохраняет 100% своей физической структуры, химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. В данном документе, например, лиофилизированный белок считается стабильным, когда не более 2% количества белка присутствует в высокомолекулярной форме после хранения при комнатной температуре в течение до 24 месяцев. В некоторых вариантах реализации лиофилизированная или иная твердая форма белка считается стабильной, когда около 3%, около

2,9%, около 2,8%, около 2,7%, около 2,6%, около 2,5%, около 2,4%, около 2,3%, около 2,2%, около 2,1%, около 2%, около 1,9%, около 1,8%, около 1,7%, около 1,6%, около 1,5%, около 1,4%, около 1,3%, около 1,2%, около 1,1%, около 1,0%, около 0,9%, около 0,8%, около 0,7%, около 0,6%, около 0,5%, около 0,4%, около 0,3%, около 0,2% или около 0,1% или менее белка находится в высокомолекулярной форме после хранения при комнатной температуре в течение около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 12 месяцев, около 13 месяцев, около 14 месяцев, около 15 месяцев, около 16 месяцев, около 17 месяцев, около 18 месяцев, около 19 месяцев, около 20 месяцев, около 21 месяца, около 22 месяцев, около 23 месяцев, около 24 месяцев, около 36 месяцев или более 18 месяцев.

[00094] В данном документе лиофилизированная или другая твердая форма белка считается «нестабильной» при комнатной температуре, если процентное изменение у высокомолекулярных частиц составляет более около 0,5%, более около 0,6%, более около 0,7%, более около 0,8% или более около 0,9% в течение первого месяца хранения при комнатной температуре. Таким образом, лиофилизированная или другая твердая форма белка с процентным увеличением у высокомолекулярных видов  $\leq 0,5\%$  в течение первого месяца хранения при комнатной температуре может рассматриваться как стабильная.

[00095] Стабильность может быть измерена, в частности, путем определения процентного содержания нативной молекулы, которая остается в композиции после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре или после доставки пациенту. Процент белка, который сохраняет свою нативную форму (например, часть нативных видов по отношению ко всему белку, включая высокомолекулярные и низкомолекулярные виды), может быть определена, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [SE-HPLC]). В случае

лиофилизированного белка, остаток сначала солюбилизирован и затем белок подвергается тестированию. Нативный белок включает белок, который не агрегируется или иным образом не деградирует. В определенных вариантах реализации по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы белка можно обнаружить в лиофилизированном остатке после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. Более 80% белка в лиофилизированном остатке должно быть в его нативной форме и предпочтительно более 90%. Определенное количество времени, после которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 13 месяцев, по меньшей мере 14 месяцев, по меньшей мере 15 месяцев, по меньшей мере 16 месяцев, по меньшей мере 17 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 19 месяцев, по меньшей мере 20 месяцев, по меньшей мере 21 месяц, по меньшей мере 22 месяца, по меньшей мере 23 месяца, по меньшей мере 24 месяца или более. Температура, при которой образцы могут храниться при оценке стабильности, может быть любой температурой от около  $-80^{\circ}\text{C}$  до около  $50^{\circ}\text{C}$ , например, при хранении при около  $-80^{\circ}\text{C}$ , около  $-30^{\circ}\text{C}$ , около  $-20^{\circ}\text{C}$ , около  $0^{\circ}\text{C}$ , около  $4-8^{\circ}\text{C}$ , около  $5^{\circ}\text{C}$ , около  $25^{\circ}\text{C}$  или другие комнатные температуры, около  $35^{\circ}\text{C}$ , около  $37^{\circ}\text{C}$  или другие физиологические температуры, около  $45^{\circ}\text{C}$  или около  $50^{\circ}\text{C}$ .

[00096] Стабильность может быть измерена, помимо прочего, путем определения процентного содержания белка, который образует агрегат (то есть, высокомолекулярные виды, то есть, виды HMW) в лиофилизированном остатке через определенное количество времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна проценту высокомолекулярных (HMW) видов, которые

образуются. Процент HMW-видов белка может быть определен, *помимо прочего*, методом эксклюзионной хроматографии после солюбилизации, как описано выше. Лиофилизированная белковая композиция также может считаться стабильной, если через три месяца при комнатной температуре менее чем около 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% или 0,1% белка обнаружено в форме HMW.

[00097] Стабильность может быть измерена путем определения процентного содержания белка, который деградирует или иным образом обнаруживается в виде низкомолекулярных (LMW) частиц в лиофилизированном остатке после определенного количества времени при определенной температуре, где стабильность обратно пропорциональна проценту LMW видов, обнаруженных в солюбилизованном лиофилизированном остатке. Процент LMW видов белка может быть определен методом эксклюзионной хроматографии, как описано выше. Белковый лиофилизированный остаток также может считаться стабильным, если через три месяца при комнатной температуре менее 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% первой молекулы обнаружен в LMW форме.

[00098] Другие методы могут быть использованы для оценки стабильности лиофилизированного белка, такие как, *например*, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термостабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и поглощение при около 350 нм или около 405 нм для определения мутности раствора. *Например*, композицию данного изобретения можно считать стабильной, если после 6 или более месяцев хранения при температуре от около 5°C до около 25°C изменение OD<sub>405</sub> композиции составляет менее чем около 0,05 (*например*, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) от OD<sub>405</sub> состава в нулевое время.

[00099] Стабильность также можно оценивать путем измерения биологической активности, физиологической активности или аффинности связывания антитела или другого белка с его мишенью. *Например*, лиофилизированное антитело может считаться стабильным,

если после хранения, например, при 5°C, 25°C, 37°C, 45°C, 50°C и т. д. в течение определенного периода времени (например, до 1 месяца, 12 месяцев, 18 месяцев, 24 месяцев и т.д.), антитело, содержащееся в лиофилизированной композиции, связывается со своим родственным эпитоп-содержащим антигеном с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 50%, 95% или более от аффинности связывания антитела до указанной лиофилизации и хранения. Аффинность связывания может быть определена, например, с помощью ELISA или плазмонного резонанса. Биологическую активность можно определить с помощью анализа активности антител, растворимого рецептора или лиганда, такого как, например, контактирование клетки, которая экспрессирует родственного связывающего партнера, с восстановленной композицией, содержащей антитело, растворимый рецептор или лиганд. Связывание антитела, растворимого рецептора или лиганда с такой клеткой может быть измерено непосредственно, например, с помощью анализа FACS. Белок может считаться «стабильным», когда биологическая или физиологическая специфическая активность (т.е. эффективность) белка составляет по меньшей мере 50% от его начальной ( $T_0$ ) эффективности после хранения при комнатной температуре в течение по меньшей мере 18 месяцев. Стабильный белок сохраняет эффективность не менее 51%, эффективность не менее 52%, эффективность не менее 53%, эффективность не менее 54%, эффективность не менее 55%, эффективность не менее 56%, эффективность не менее 57%, эффективность не менее 58%, эффективность не менее 59%, эффективность не менее 60%, эффективность не менее 61%, эффективность не менее 62%, эффективность не менее 63%, эффективность не менее 64%, эффективность не менее 65%, эффективность не менее 66%, эффективность не менее 67%, эффективность не менее 68%, эффективность не менее 69%, эффективность не менее 70%, эффективность не менее 71%, эффективность не менее 72%, эффективность не менее 73%, эффективность не менее 74%, эффективность не менее 75%, эффективность не менее 76%, эффективность не менее 77%, эффективность не менее 78%,

эффективность не менее 79%, эффективность не менее 80%,  
 эффективность не менее 81%, эффективность не менее 82%,  
 эффективность не менее 83%, эффективность не менее 84%,  
 эффективность не менее 85%, эффективность не менее 86%,  
 эффективность не менее 87%, эффективность не менее 88%,  
 эффективность не менее 89%, эффективность не менее 90%,  
 эффективность не менее 91%, эффективность не менее 92%,  
 эффективность не менее 93%, эффективность не менее 94%,  
 эффективность не менее 95%, эффективность не менее 96%,  
 эффективность не менее 97%, эффективность не менее 98% или  
 эффективность не менее 99% после хранения до 12 месяцев, до 13  
 месяцев, до 14 месяцев, до 15 месяцев, до 16 месяцев, до 17  
 месяцев, до 18 месяцев, до 19 месяцев, до 20 месяцев, до 21  
 месяца, до 22 месяцев, до 23 месяцев или до 24 месяцев при  
 комнатной температуре.

[000100] «Стабильный» белок практически не претерпевает  
 изменений в структуре или специфической активности после  
 хранения при комнатной температуре в течение длительного периода  
 времени, например до 18 месяцев. Изменения в структуре включают  
 образование агрегатов или других высокомолекулярных форм белка,  
 деградацию белка, такую как гидролиз пептидных связей, и  
 химическую деградацию, такую как дезамидирование,  
 асалилирование и тому подобное. Например, обычной формой  
 деградации антител является образование агрегатов, которые  
 включают обратимые димеры и тримеры, а также более стабильные и  
 менее обратимые тетрамеры и мультимеры более высокого порядка.  
 «Необратимые агрегаты» представляют собой подгруппу агрегатов,  
 которые тяжело солюбилизируют или не связываются при  
 восстановлении лиофилизированного остатка. «Стабильный» белок  
 подвергается увеличению образования высокомолекулярных частиц,  
 которое составляет менее 15%, менее 14%, менее 13%, менее 12%,  
 менее 11%, менее 10%, менее чем 9%, менее 8%, менее 7%, менее  
 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, менее 1% или менее  
 0,5% во время хранения при комнатной температуре до 7 месяцев,  
 до 8 месяцев, до 9 месяцев, до 10 месяцев, до 11 месяцев, до 12  
 месяцев, до 13 месяцев, до 14 месяцев, до 15 месяцев, до до 16

месяцев, до 17 месяцев, до 18 месяцев, до 19 месяцев, до 20 месяцев, до 21 месяца, до 22 месяцев, до 23 месяцев или до 24 месяцев. Методы обнаружения высокомолекулярных видов могут иметь вариабельность обнаружения от 0,2 до 0,3%.

[000101] Зависящая от температуры скорость агрегации белка или другого образования высокомолекулярных частиц следует за кинетикой Аррениуса или модифицированной кинетикой Аррениуса (слегка изогнутые графики Аррениуса) (см., например, Chakroun *et al.*, "Mapping the Aggregation Kinetics of a Therapeutic Antibody Fragment," *Mol.Pharmaceut.* 13: 307-319 (2016)). Таким образом, скорости агрегации и процентное изменение в высокомолекулярных частицах при данной температуре для данной композиции со временем могут быть предсказаны на основе квадратного корня во временной зависимости и кинетики Аррениуса или модифицированной кинетики Аррениуса. Например, лиофилизированные образцы инкубируют при заданной температуре (например, 5°C, 25°C, 37°C, 50°C) в запечатанных стеклянных пузырьках. Аликвоты отбирают через равные промежутки времени, удаляют нерастворимые агрегаты и затем подвергают SE-HPLC. Наблюдаемые скорости агрегации определяются непосредственно из линейного соответствия, зависящего от времени, основного пика в зависимости от площади пика НМВ. Прогнозы процентного изменения у высокомолекулярных частиц затем делаются путем применения квадратного корня в законе скорости времени и кинетике Аррениуса к данным. Например, наблюдаемая константа скорости при различных температурах затем подгоняется к уравнению Аррениуса:  $\ln k = \ln A - (E/RT)$ , где  $E$  - энергия активации (в кал/моль),  $R$  - универсальная газовая постоянная (1,987 кал/моль/К),  $T$  - абсолютная температура (в Кельвинах) и  $\ln A$  - постоянная температуры, которая включает такие факторы, как частота столкновений. Значение  $k$  экстраполируется из аппроксимации Аррениуса, чтобы предсказать изменение высокомолекулярных частиц при данной температуре (например, 25°C) во времени (например, 24 месяца).

### **Ллиофилизация**

[000102] Способы лиофилизации белков в целом и терапевтических антител или других антигенсвязывающих белков, в частности, хорошо известны в данной области. Вкратце, в одном варианте реализации, лиофилизация начинается с предварительно лиофилизированного водного раствора, содержащего лекарственное вещество и наполнители, как описано выше. Предварительно лиофилизированный водный раствор помещают в открытый контейнер (например, пузырек) и открытый контейнер помещают в камеру лиофилизации на полку. Процесс лиофилизации включает три основных стадии: (1) замораживание с необязательными циклами отжига, (2) первичная сушка и (3) вторичная сушка с необязательной стадией отжига после сушки. Первая стадия - замораживание. На данной стадии температура полки понижается для охлаждения препарата в пузырьке. Внутри композиции образуются ледяные кристаллы и остальная часть композиции становится более концентрированной и вязкой. Концентрированный остаток затвердевает с образованием аморфного, кристаллического или комбинированного кристаллического/аморфного состояния. В одном варианте реализации остаток затвердевает в аморфном стеклообразном состоянии.

[000103] В некоторых методиках лиофилизации, замороженную композицию подвергают отжигу для усиления кристаллизации. Твердый остаток выдерживают при температуре выше конечной температуры замерзания в течение некоторого периода времени для кристаллизации некоторых компонентов, таких как наполнители, такие как маннитол и глицин.

[000104] Лед затем удаляется сублимацией. Давление в камере лиофилизации (например, 40-400 Торр) и температура полки ( $-30^{\circ}\text{C}$  -  $+10^{\circ}\text{C}$ ) устанавливаются ниже тройной точки воды. Температура поддерживается ниже температуры стеклования ( $T_g$ ) для аморфных остатков, чтобы предотвратить разрушение структуры остатка.

[000105] Некоторое количество воды может оставаться в матрице после стадии первичной сушки. Оставшаяся вода удаляется в процессе десорбции на стадии вторичной сушки. На данной стадии, температура полки увеличивается для ускорения десорбции

и достижения оптимального содержания влаги в лиофилизированном продукте. В одном варианте реализации конечное содержание влаги составляет не менее около 0,5% и не более около 10%. В другом варианте реализации конечное содержание влаги составляет не менее около 3% и не более около 6%. В специфическом варианте реализации содержание влаги составляет более 3%, но менее 4%. В другом специфическом варианте реализации содержание влаги составляет около 3%. В другом специфическом варианте реализации, содержание влаги составляет около 3,5%. В другом специфическом варианте реализации, содержание влаги составляет около 4%. В другом специфическом варианте реализации, содержание влаги составляет около 4,5%. В еще одном специфическом варианте реализации содержание влаги составляет около 6%.

[000106] В одном варианте реализации лиофилизированный продукт («лиофилизированный остаток») подвергается стадии отжига после стадии вторичной сушки. Отжиг после стадии сушки также называют физическим старением или структурной релаксацией. Эта стадия отжига после сушки способствует релаксации аморфной матрицы к равновесному стеклообразному состоянию (альфа-релаксация), увеличению времени структурной релаксации при температуре хранения, снижению подвижности в стеклообразном состоянии, вероятно, понижению белка до более стабильного энергетического состояния, тем самым оптимизируя стабильность белка. В данном документе стадия отжига кратковременно ускоряет молекулярную подвижность, чтобы обеспечить общее снижение энтропии стеклообразного состояния и вращательных форм белка.

[000107] После стадии отжига, число случайных термодинамических молекулярных стеклообразных состояний сводится к минимуму и равновесие стекла максимизируется. В некоторых вариантах реализации температура отжига ниже  $T_g$  продукта. В некоторых вариантах реализации температура отжига составляет от 25°C до около 90°C, от 25°C до около 80°C, от 25°C до около 75°C, от около 25°C до около 70°C, от 35°C до около 70°C, от 40°C до около 70°C, от 30°C до около 55°C, от 50°C до около 60°C, от 55°C до около 65°C, от 60°C до около 70°C, от 65°C до около 75°C, от

70°C до около 80°C или от 75°C до около 85°C. В некоторых вариантах реализации температура отжига составляет около 90°C, около 80°C, около 79°C, около 78°C, около 77°C, около 76°C, около 75°C, около 74°C, около 73°C, около 72°C, около 71°C, около 70°C, около 69°C, около 68°C, около 67°C, около 66°C, около 65°C, около 64°C, около 63°C, около 62°C, около 61°C, около 60°C, около 59°C, около 58°C, около 57°C, около 56°C, около 57°C, около 56°C, около 55°C, около 54°C, около 53°C, около 52°C, около 51°C, около 50°C, около 49°C, около 48°C, около 47°C, около 46°C, около 45°C, около 44°C, около 43°C, около 42°C, около 41°C, около 40°C, около 39°C, около 38°C, около 37°C, около 36°C, около 35°C, около 34°C, около 33°C, около 32°C, около 31°C, около 30°C, около 29°C, около 28°C, около 27°C, около 26°C или 25°C. В специфическом варианте реализации температура отжига выше 25°C. В другом специфическом варианте реализации температура отжига выше 50°C.

[000108] Лиофилизированный остаток выдерживают при температуре отжига в течение периода времени, достаточного для того, чтобы сделать возможным релаксацию структуры остатка, что определяется восстановлением энтропии из ДСК или изотермической калориметрии. В некоторых вариантах реализации температуру отжига поддерживают от около 12 часов до около двух недель, от около 12 часов до одной недели, от около 12 часов до около нескольких дней, от около 18 часов до около 72 часов, от около 24 часов до около 36 часов, от около 30 часов до около 42 часов, от около 36 часов до около 48 часов, от около 42 часов до около 54 часов, от около 48 часов до около 60 часов, от около 54 часов до около 66 часов, от около 60 часов до около 72 часов, от около 66 часов до около 78 часов или от около 72 часов до около 84 часов. В некоторых вариантах реализации температуру отжига поддерживают в течение около 12 часов, около 13 часов, около 14 часов, около 15 часов, около 16 часов, около 17 часов, около 18 часов, около 19 часов, около 20 часов, около 21 часа, около 22 часов, около 23 часов, около 24 часов, около 25 часов, около 26 часов, около 27 часов, около 28 часов, около 29 часов, около 30

часов, около 31 часа, около 32 часов, около 33 часов, около 34 часов, около 35 часов, около 36 часов, около 37 часов, около 38 часов, около 39 часов, около 40 часов, около 41 часа, около 42 часов, около 43 часов, около 44 часов, около 45 часов, около 46 часов, около 47 часов, около 48 часов, около 49 часов, около 50 часов, около 51 часа, около 52 часов, около 53 часов, около 54 часов, около 55 часов, около 56 часов, около 57 часов, около 58 часов, около 59 часов, около 60 часов, около 61 часа, около 62 часов, около 63 часов, около 64 часов, около 65 часов, около 66 часов, около 67 часов, около 68 часов, около 69 часов, около 70 часов, около 71 часа, около 72 часов, около 73 часов, около 74 часов, около 75 часов, около 76 часов, около 77 часов, около 78 часов, около 79 часов, около 80 часов, около 81 часа, около 82 часов, около 83 часов или около 84 часов.

[000109] В специфическом варианте реализации температура отжига выше 50°C, которая поддерживается в течение примерно 72 часов. В другом специфическом варианте реализации температура отжига составляет около 25°C, которая поддерживается в течение около 72 часов.

[000110] В одном варианте реализации условия отжига определяются экспериментально путем проведения стадии отжига после сушки в дифференциальном сканирующем калориметре. Эндотермическая область температурной кривой обычно возникает сразу после эффекта отжига, что позволяет практикующему врачу выбрать температуру отжига. См. Sartor et al., "Calorimetric Studies of the Kinetic Unfreezing of Molecular Motions in Hydrated Lysozyme, Hemoglobin, and Myoglobin," 66 Biophysical J. 249-258 (1994). Примеры

[000111] Следующие примеры приведены с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное описание того, как получать и применять способы и композиции изобретения, и не предназначены для ограничения объема изобретения, которое авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например, количеств, размеров и

тому подобное), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

#### **Пример 1: Методика лиофилизации**

[000112] Водный раствор для предварительной лиофилизации, содержащий антитело и наполнители (как описано в данном документе), загружали в пузырек из боросиликатного стекла Типа I. Заполненный пузырек помещали в лиофилизатор LYOSTAR 3 (SP Scientific, Warminster, PA). Камеру закрывали и температуру полки снижали до 5°C. Образец выдерживали при 5°C в течение 30 минут до замораживания. Скорость изменения при замораживании составляла 0,5°C/мин. Температуру полки выдерживали при -45°C в течение 60 минут.

[000113] Первичную сушку выполняли при заданном значении вакуума около 100 мТорр и температуре полки около -25°C, что достигалось при скорости изменения нагрева около 0,5°C/мин в течение около 50 часов.

[000114] Вторичная сушка проводилась при 35°C, которая была достигнута при скорости изменения для нагревания около 0,3°C/мин. Вторичная сушка продолжалась около 6 часов.

[000115] После вторичной сушки камеру заполняли газообразным азотом до давления около 0,8 атмосфер (около 608000 мТорр) и пузырек закупоривали бутылкаучуковой пробкой для лиофилизации 4432/50 с покрытием Flurotec®.

#### **Пример 2: Стабильность белка в зависимости от содержания влаги**

[000116] Молекулы воды могут служить пластификатором и стабилизатором в лиофилизированном продукте. Вода пригодна в качестве пластификатора из-за ее небольшого размера и способности образовывать водородные связи с другими молекулами воды и другими молекулами (такими как молекулы белка). Преимущество использования воды в качестве стабилизатора/пластификатора заключается в том, что соотношение стабилизатора (воды) к белку может быть увеличено без влияния на тоничность восстановленной композиции. Содержание влаги можно регулировать путем проектирования процесса лиофилизации.

Содержание влаги в лиофилизированных остатках определяли анализатором влажности Computrac® Vapor Pro® (Arizona Instrument LLC, Chandler, AZ).

[000117] Рекомбинантные моноклональные антитела (mAb1, mAb2, mAb3) продуцировались в клетках EESYR® (см. патент США № 7,771,997 B2, выданный 10 августа 2010 г.) и образовывались в концентрации 150 мг/мл в 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 5% сахарозы и 1,54% аргинина (все % мас./об.в предварительно лиофилизированной жидкой композиции). Жидкую композицию лиофилизировали, как описано выше, до специфических уровней содержания влаги (% вес/вес) и хранили при 50°C, 37°C или 25°C в течение определенного времени. После хранения лиофилизированные композиции восстанавливали водой и подвергали эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого разрешения (SE-HPLC). Высокомолекулярные виды (HMW) были обнаружены, интегрированы и сравнены с контролями при T=0. Процентное изменение HMW видов как части общего белка было рассчитано и представлено в Таблице 1. Лيوфилизированный 150 мг/мл mAb1 был наиболее стабильным с содержанием влаги около 4,5% при хранении при 25°C.

[000118] Было предсказано, что лиофилизированные композиции mAb1, имеющие влажность 3-10%, деградируют ~ 2,0% после 24 месяцев хранения при 25°C. Алгоритмы кинетики Аррениуса были применены к измеренным скоростям деградации и прогнозы, основанные на квадратном корне в законе скорости времени, составляли не менее 24 месяцев. Процентное изменение HMW видов для каждой точки содержания влаги приведено в Таблице 2. Предварительно лиофилизированная водная композиция содержит 150 мг/мл mAb1, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 5% сахарозы, 1,54% аргинина.

### **Пример 3: Эффект отжига после сушки**

[000119] Стабильность белка была улучшена путем отжига лиофилизированного лекарственного продукта. Предполагается, что отжиг лиофилизированной композиции ниже температуры стеклования приводит к релаксации аморфных молекул до более низкого

энергетического состояния с получением более стабильного продукта. Отжиг лиофилизированной композиции в течение 72 часов при 70°C привел к более низкому наблюдаемому увеличению % HMW для 150 мг/мл mAb1, лиофилизированного с 10% сахарозы и 3,08% аргинина (предварительно лиофилизированная композиция: 150 мг/мл mAb1, 10 mM гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, 10% сахарозы, 3,08% аргинина). Изменение в процентах HMW видов антител приведено в Таблице 3 для отоженных и неотоженных композиций, хранящихся в течение 6 месяцев при 25°C, 37°C и 50°C.

[000120]

Таблица 1: Процент увеличения в высокомолекулярных видах

Температура °C		50			37			25		
Время (месяцы)		0,5	1	2	1	3	6	1	3	6
%	0	3,6	5,16	7,79	1,72	3,37	5,0	0,55	1,19	1,8
	0,5	3,1	4,42	6,84	1,48	2,91	4,3	0,51	1,02	1,6
	1,5	2,4	3,56	5,54	1,07	2,19	3,3	0,31	0,7	1,1
	3,0	2,3	3,38	5,46	0,88	1,77	2,9	0,26	0,55	0,9
	4,5	2,7	3,77	6,18	0,91	1,86	2,9	0,22	0,46	0,7
	6,0	2,1	4,6	7,75	0,9	2,33	HO	0,1	0,63	HO
	8,0	2,9	5,8	10,67	1,4	2,98	HO	0,2	0,92	HO
	10	3,6	7,0	13,29	1,8	4,14	HO	0,4	1,16	HO

Таблица 2: Прогноз деградации при 25°C 150 мг/мл лиофилизированного mAb1 - Δ% HMW видов

Время H <sub>2</sub> O	1 мес	3 мес	6 мес	9 мес	12 мес	18 мес	24 мес
0%	0,77	1,33	1,89	2,31	2,67	3,24	3,77
0,5%	0,66	1,14	1,61	1,97	2,27	2,78	3,21
1,5%	0,47	0,82	1,16	1,42	1,64	2,01	2,32

3,0%	0,36	0,63	0,89	1,09	1,26	1,54	1,78
4,5%	0,31	0,55	0,77	0,94	1,09	1,34	1,54
6,0%	0,34	0,60	0,84	1,03	1,19	1,46	1,69
8,0%	0,49	0,85	1,20	1,47	1,70	2,08	2,41
10%	0,64	1,11	1,58	1,93	2,23	2,73	3,15

[000121] Алгоритмы кинетики Аррениуса были применены к измеренным скоростям деградации и проекции, основанные на значении квадратного корня в законе скорость от времени, составляли не менее 24 месяцев для отоженных образцов по сравнению с неотоженными образцами, хранящимися при 37°C. Прогнозируется, что отжиг даст примерно на 20% меньше НМВ видов, чем в неотоженном образце через 24 месяца (т.е. 5,76% против 6,05%  $\Delta\% \text{НМВ}$ ).

**Таблица 3:  $\Delta\%$  НМВ с отжигом против без отжига**

Температура	Отжиг	Без отжига
25°C	0,2%	0,6%
37°C	0,5%	1,5%
50°C	0,8%	2,1%

**Пример 4: Влияние отдельных наполнителей на стабильность**

[000122] Специфические стабилизаторы, включая сахара, полиолы, соли и аминокислоты, оценивали по их индивидуальной способности стабилизировать лиофилизированное антитело. Лيوфилизированный 150 мг/мл mAb1 был наиболее стабильным при введении в состав сахарозы (см. Таблица 4).  $T_g$  композиции сахарозы достаточно высока (~ 110°C) для хранения при комнатной температуре и обеспечивает достаточную широту для добавления пластификатора, если необходимо.

**Пример 5: Влияние комбинации трегалозы на стабильность**

[000123] Комбинирование трегалозы или сахарозы с пластификаторами, такими как сорбитол или маннитол, неожиданно привело к получению более стабильной композиции при комнатной температуре. Комбинации сорбитола и трегалозы стабилизировали лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 больше, чем одна трегалоза.

Основная предварительно лиофилизованная композиция содержала mAb1 150 мг/мл, 10 мМ гистидина, рН 6,0, 0,1% полисорбата 80, к которому были добавлены различные комбинации трегалозы и сорбитола до лиофилизации. Стабильность лиофилизованного белка в комбинации с трегалозой и/или сорбитолом была представлена в таблице как  $\Delta\%HMW$  в Таблице 5.

**Таблица 4: Влияние отдельных наполнителей на mAb1  $\Delta\%HMW$**

	50°C @ 0,5 мес.	50°C @ 1 мес.	50°C @ 2 мес.	25°C @ 4 мес.
Нет стабилизатора	23,74	32,33	43,76	11,04
10% сахарозы	2,68	4,12	6,24	0,87
10% трегалозы	4,02	5,98	8,9	1,66
3,36% пролина	9,08	13,48	19,52	3,79
5,32% сорбитол	8,29	12,45	18,32	1,83
5,32% маннитол	4,98	7,61	11,58	1,4
2,19% глицина	8,57	12,3	18,63	3,28
0,85% NaCl	8,43	11,54	17,95	2,28
2,69% глицерина	12,86	17,34	25,91	4,49
3,08% аргинина	6,66	10,06	14,86	2,95
2,60% аланина	9,84	14,58	22,23	4,03

**Таблица 5: Влияние трегалозы и/или сорбитола на mAb1  $\Delta\%HMW$**

	Комбинация стабилизатора			
	10% трегалозы	6,66% трегалозы, 1,77% сорбитола	5% трегалозы, 2,66% сорбитола	3,88% трегалозы, 3,55% сорбитола
25°C (6 месяцев)	2,0%	1,8%	1,8%	1,8%
37°C (6 месяцев)	5,4%	5,0%	5,1%	5,6%
50°C (6 месяцев)	8,1%	7,9%	8,5%	9,8%
25°C (24 месяца) *	4,06%	3,43%	3,26%	3,26%

\*Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорости от времени и кинетике Аррениуса.

**Пример 6: Влияние комбинации сахарозы на стабильность**

[000124] Комбинации маннитола и сахарозы стабилизировали лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 больше, чем одна сахароза. Основная предварительно лиофилизированная композиция содержит 150 мг/мл mAb1, 10 мМ гистидина, pH 6,0, 0,1% полисорбата 80, к которому были добавлены различные комбинации сахарозы и маннитола до лиофилизации. Стабильность лиофилизированного белка в комбинации с сахарозой и/или маннитолом была представлена в таблице как  $\Delta\%HMW$  в Таблице 6. Комбинация маннитола и сахарозы стабилизировали лиофилизированную 150мг/мл mAb1 больше, чем одна сахароза.

**Таблица 6: Влияние сахарозы и маннитола на mAb1  $\Delta\%HMW$**

	Комбинация стабилизатора	
	10% сахарозы	5% сахарозы, 2,66% сорбитола
25°C (6 месяцев)	1,6%	1,3%
37°C (6 месяцев)	4,0%	3,7%
50°C (2 месяца)	5,9%	7,2%
25°C (24 месяца)*	2,86%	2,52%

\*Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорости от времени и кинетике Аррениуса.

[000125] Сахарозу объединяли с полиолами и аминокислотами для оценки способности стабилизировать лиофилизированное антитело. MAb1 150 мг/мл объединяли с сахарозой (Suc) и любым из сорбитола (Sor), глицерина (Gly), аргинина (Arg) и аланина (Ala) в различных пропорциях. Изменение HMW видов оценивали при 25°C и 5°C при различных периодах времени хранения. Результаты ( $\Delta\%HMW$ ) представлены в Таблице 7. Ни одна из протестированных комбинаций наполнителей не стабилизировала лиофилизированную mAb1 150 мг/мл больше, чем одна сахароза при хранении при 25°C. Неожиданно было предсказано, что комбинация сорбитола и сахарозы улучшает стабильность по сравнению с одной сахарозой при хранении при 5°C в течение 120 месяцев и является более стабильной, чем одна сахароза.

**Пример 7: Эффекты комбинации сахарозы и аргинина на стабильность лекарственного вещества**

[000126] Лиофилизированный 150 мг/мл mAb1 и лиофилизированный 150 мг/мл mAb2 имеют сопоставимую стабильность при смешивании с 10% сахарозой и 3,08% аргинина. Изменение в % HMW видов рассчитывали при 1 месяце хранения при 25°C, 37°C и 50°C. Было предсказано, что лиофилизированный mAb1 150 мг/мл и лиофилизированный mAb2 150 мг/мл (на основе квадратного корня в законе скорости и кинетики Аррениуса) будут иметь сравнимую стабильность при образовании с 10% сахарозы и 3,08% аргинина при 25°C до 24 месяцев и далее. Результаты анализа  $\Delta\%HMW$  представлены в Таблице 8.

**Таблица 7: Влияние других наполнителей в комбинации с сахарозой на mAb1  $\Delta\%HMW$**

	25°C/1 мес.	25°C/3 мес.	25°C/6 мес.	* 25°C/24 мес.	* 5°C/120 мес.
10,0% сахарозы	0,47%	0,96%	1,55%	3,08%	1,18%
9,09% Suc/0,48% Sor	0,53%	1,04%	1,60%		
8,33% Suc/0,89% Sor	0,47%	0,65%	1,52%		
6,66% Suc/1,77% Sor	0,46%	0,98%	1,53%		
5,00% Suc/2,66% Sor	0,48%	1,02%	1,55%	3,08%	0,90%
9,09% Suc/0,24% Gly	0,52%	1,06%	1,66%		
8,33% Suc/0,45% Gly	0,55%	1,11%	1,72%		
6,66% Suc/0,90% Gly	0,65%	1,27%	2,05%		
5,00% Suc/1,34% Gly	0,71%	1,48%	2,32%	4,68%	1,48%
9,09% Suc/0,28% Arg	0,51%	1,02%	1,61%		
8,33% Suc/0,51% Arg	0,50%	1,03%	1,61%		
6,66% Suc/1,03% Arg	0,57%	1,14%	1,83%		
5,00% Suc/1,54% Arg	0,65%	1,35%	2,08%	4,21%	1,68%

9,09% Suc/0,24% Ala	0,50%	0,99%	1,58%		
8,33% Suc/0,43% Ala	0,54%	1,05%	1,64%		
6,66% Suc/0,87% Ala	0,65%	1,30%	1,91%		
5,00% Suc/1,30% Ala	0,72%	1,54%	2,45%	4,90%	1,79%

\* Проекция основаны на значения квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

**Таблица 8: Влияние 10% сахарозы/3,08% аргинина на mAb1 и mAb2 Δ% НМВ**

mAb1				mAb2			
25°C (1 мес.)	37°C (1 мес.)	50°C (1 мес.)	* 25°C (24 мес.)	25°C (1 мес.)	37°C (1 мес.)	50°C (1 мес.)	* 25°C (24 мес.)
0,2%	0,5%	1,5%	0,97%	0,1%	0,5%	1,5%	0,71%

\* Проекция основаны на значения квадратного корня в законе скорость от времени и кинетике Аррениуса.

**Пример 8: Влияние соотношения стабилизатора к лекарственному продукту на стабильность лекарственного продукта**

[000127] Комбинации сахарозы и аргинина были образованы с антителами в различных пропорциях по массе, и значение Δ%НМВ было определено в разное время при 50°C и 25°C. Предполагается, что составы лиофилизированных антител 150 мг/мл со стабилизатором ≥0,87:1 (на основе значения квадратного корня в законе скорость от времени и кинетики Аррениуса) деградируют на ≤1% после 24 месяцев хранения при 25°C. Результаты приведены в Таблице 9.

**Таблица 9: Влияние соотношения стабилизатора к белку на стабильность (Δ%НМВ)**

Сахароза/ Аргинин	Стабилизатор: антитело	50°C (0,5 мес)	50°C (1 мес)	50°C (2 мес)	* 25°C (24 мес)
5%/1,5%	0,44:1	3,7%	5,4%	8,2%	3,74%
7,5%/2,3%	0,65:1	1,9%	2,7%	4,1%	1,77%
10%/3,1%	0,87:1	1,0%	1,5%	2,3%	0,97%
12,5%/3,9%	1,1:1	0,6%	0,9%	1,3%	0,43%

15%/4,6%	1,3:1	0,4%	0,6%	0,9%	0,35%
----------	-------	------	------	------	-------

\* Проекция основаны на значениях квадратного корня в законе скорости от времени и кинетике Аррениуса.

**Таблица 10: Влияние отдельных наполнителей на mAb3 Δ%НМВ**

	50°C @ 0,5 мес.	50°C @ 1 мес.	50°C @ 2 мес.	25°C @ 7 мес.
Нет стабилизатора	1,4%	2,31%	3,34%	0,78%
10% сахарозы	0,03%	0,03%	0,04%	0,04%
10% трегалозы	0,09%	0,08%	0,16%	0,23%
3,36% пролина	2,0%	2,92%	12,37%	3,25%
5,32% сорбитола	3,5%	6,24%	8,85%	1,47%
5,32% маннитола	21,55%	26,87%	30,78%	14,44%
2,19% глицина	9,67%	16,22%	24,39%	3,77%
0,85% NaCl	4,51%	6,4%	7,83%	6,27%
3,08% аргинина	0,05%	0,14%	0,09%	0,04%
2,60% аланина	18,04%	22,18%	23,68%	14,74%

**Пример 9: Стабилизирующее действие наполнителей на лиофилизированный белок на низкую концентрацию белка в предварительно лиофилизированной жидкой композиции**

[000128] Специфические стабилизаторы, включая сахара, полиолы, соли и аминокислоты, оценивали по их индивидуальной способности стабилизировать лиофилизированное антитело. Лиофилизированный 2 мг/мл mAb3 не показал заметной деградации, когда в качестве стабилизатора были включены сахароза, трегалоза или аргинин. Результаты представлены в Таблице 10. Глицерин также тестировали, но после лиофилизации наблюдалась значительная деградация.

[000129] Трегалозу объединяли с полиолами и аминокислотами для оценки способности стабилизировать лиофилизированное

антитело. 2 мг/мл mAb3 объединяли с трегалозой (Tre) и любым из сорбитола (Sor), глицерина (Gly), аргинина (Arg) и аланина (Ala) в различных пропорциях. Изменение HMW видов оценивали при 25°C в различные сроки хранения. Результаты ( $\Delta\%HMW$ ) представлены в Таблице 11. Не наблюдалось заметной деградации ни в одной из лиофилизированных комбинаций mAb3 2 мг/мл, протестированных после 3 месяцев хранения при 25°C

**Таблица 11: Влияние трегалозы и других наполнителей на стабильность mAb3 с низкой концентрацией ( $\Delta\%HMW$ )**

	25°C/1 мес.	25°C/3 мес.	*25°C/120 мес.
10,0% трегалозы	0,01%		0,007%
9,09% Тре/0,48% Сор		0,03%	
6,66% Тре/1,77% Сор		0,01%	
5,00% Тре/2,66% Сор	0,01%		
5,00% Тре/1,34% Сор			0,007%
9,09% Тре/0,24% Гли	0,01%		
5,00% Тре/1,34% Гли		0,02%	
5,00% Тре/0,90% Гли			0,10%
9,09% Тре/0,28% Арг		0,01%	
8,33% Тре/0,51% Арг	0,04%	0,01%	
6,66% Тре/1,03% Арг	0,03%	0,04%	
5,00% Тре/1,54% Арг	0,05%	0,05%	0,33%
9,09% Тре/0,24% Ала	0,01%		
8,33% Тре/0,43% Ала	0,08%	0,08%	
6,66% Тре/0,87% Ала	0,06%	0,12%	
5,00% Тре/1,30% Ала	0,04%	0,2%	1,03%

\* Проекция основаны на значении квадратного корня в законе скорости от времени и кинетике Аррениуса.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения лиофилизированного остатка, включающий получение пептидного или белкового состава и проведение лиофилизации пептидного или белкового состава с получением лиофилизированного остатка, содержащего приблизительно 4% по весу влаги, приблизительно 5% по весу сахарозы и аргинин при массовом отношении сахарозы к аргинину от приблизительно 3,2:1 до приблизительно 3,4:1; где пептидный или белковый состав содержит пептид или белок.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий пост-лиофилизационный отжиг лиофилизированного остатка.

3. Способ по п.1, в котором пептидный или белковый состав дополнительно содержит стабилизатор, криопротектор, наполнитель, пластификатор или их комбинацию.

4. Способ по п.3, в котором стабилизатор представляет собой агент, замещающий водородную связь.

5. Способ по п.3, в котором криопротектор представляет собой поверхностно-активное вещество, сахар, соль или аминокислоту.

6. Способ по п.3, в котором наполнитель представляет собой маннит, глицин или их комбинации.

7. Способ по п.3, в котором пластификатор представляет собой воду или глицин.

8. Способ по п.3, в котором наполнитель находится в кристаллическом состоянии в лиофилизированном остатке.

9. Способ по п.3, в котором стабилизатор или криопротектор находится в аморфном состоянии в лиофилизированном остатке.

10. Способ по п.1, в котором пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-участок антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственное средство.

11. Способ по п.3, в котором концентрация наполнителя составляет менее 2%.

12. Способ по п.1, в котором концентрация пептида или белка в пептидном или белковом составе составляет по меньшей мере 100 мг/мл, причем пептидный или белковый состав дополнительно содержит средство, снижающее вязкость.

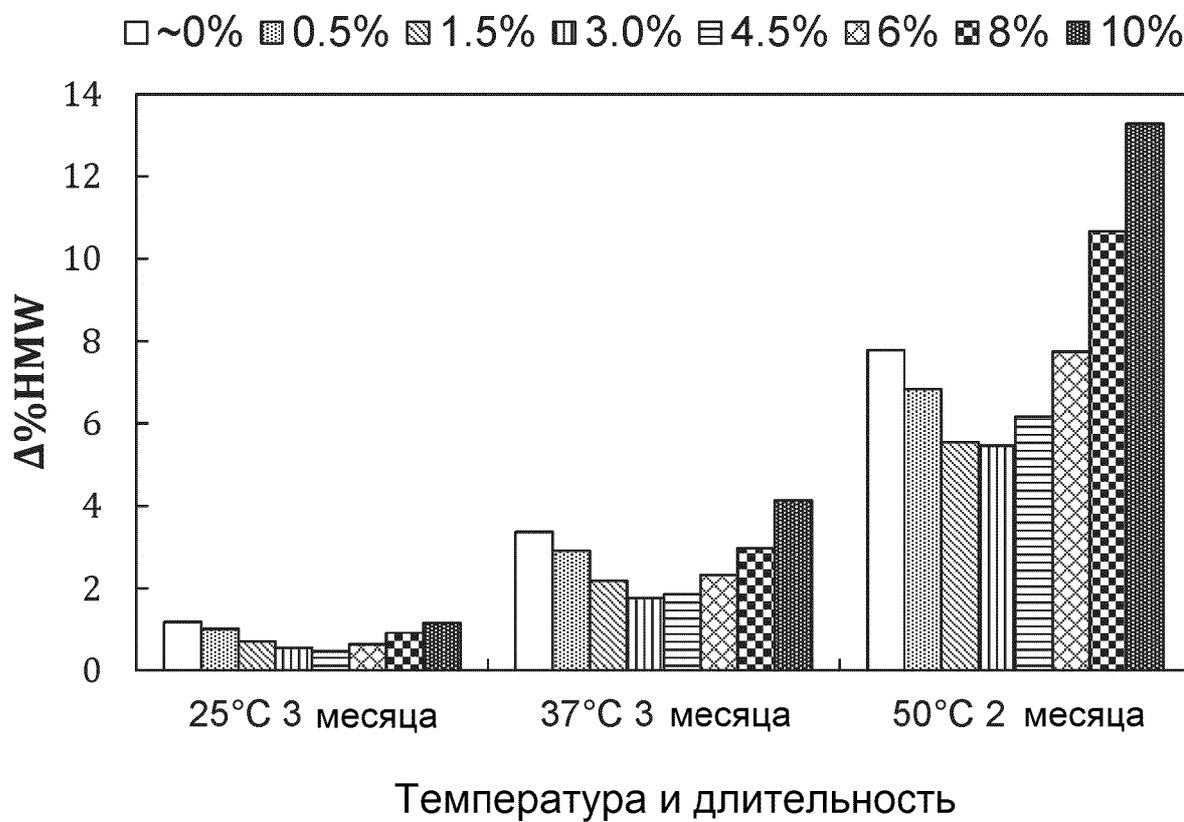
13. Способ по п.1, в котором пептидный или белковый состав представляет собой изотонический состав.

14. Способ по п.1, в котором пептидный или белковый состав лиофилизированного остатка дополнительно содержит приблизительно 2,66 мас.% маннита.

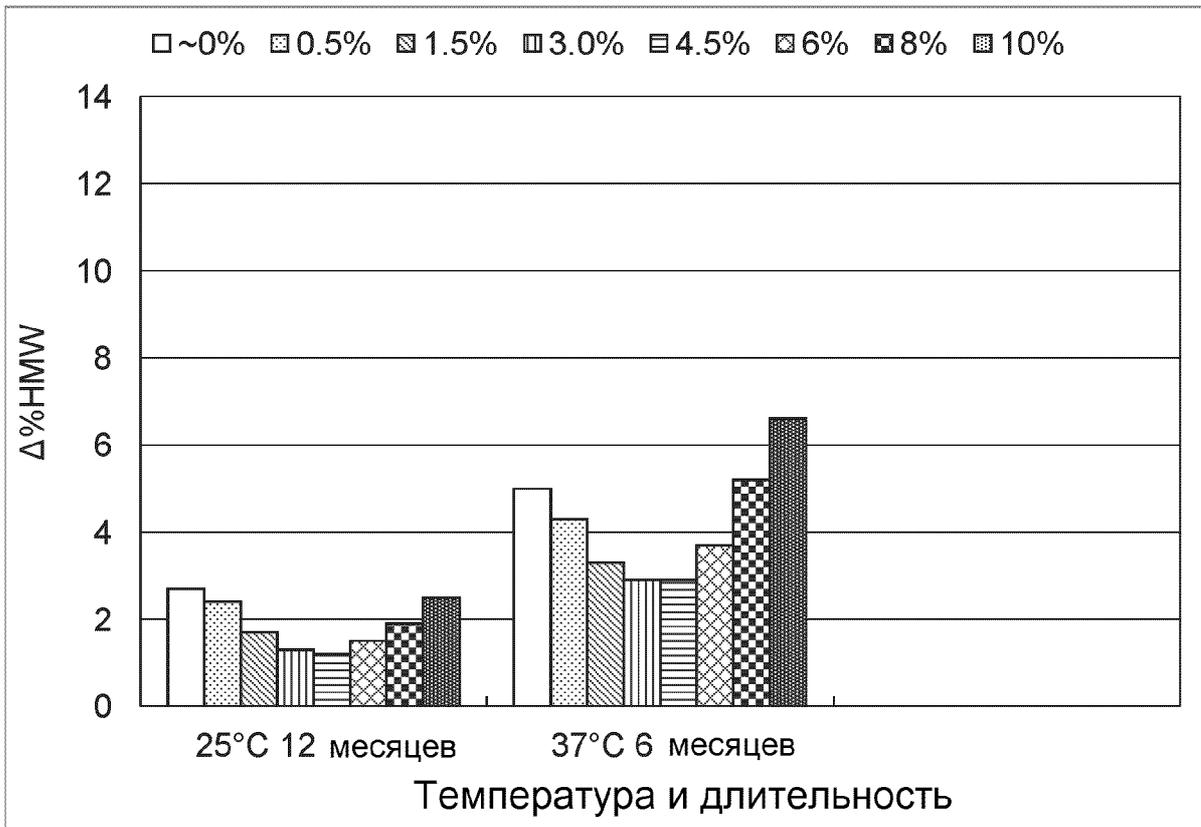
15. Способ по п.1, в котором пептидный или белковый состав лиофилизированного остатка дополнительно содержит 1% глицина.

16. Лиофилизированный остаток, полученный способом по п.1.

По доверенности



ФИГ. 1



ФИГ. 2

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 8750WO01	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2017/055651	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 6 October 2017 (06-10-2017)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 7 October 2016 (07-10-2016)
Applicant  REGENERON PHARMACEUTICALS, INC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/US2017/055651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. A61K9/00      A61K9/08      A61K9/19      A61K38/00  
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHANG LIUQUAN LUCY ET AL: "Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix?", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY AND AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 94, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 1427-1444, XP002482199, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20364	1-9, 12-16, 21,22, 25,26, 30-40, 45, 50-64, 66-68, 70,73, 74,79-84
Y	Lyophilization Process; page 1429 tables 1,2 page 1430, column 2 ----- -/--	1-84

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  14 December 2017	Date of mailing of the international search report  08/01/2018
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Schüle, Stefanie
--	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/055651

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/148337 A1 (WYETH LLC [US]; TCHESALOV SERGUEI [US]; KANTOR ANGELA [US]; LI LI [US] 23 December 2010 (2010-12-23)	1-16,19, 20, 27-40, 50-70, 79-84
Y	tables 10,11 examples	1-84
X	----- BREEN E D ET AL: "Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation", PHARMACEUTICAL RESEARCH, SPRINGER NEW YORK LLC, US, vol. 18, no. 9, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1345-1353, XP002550626, ISSN: 0724-8741, DOI: 10.1023/A:1013054431517	1-16, 27-40, 50-68, 79-84
Y	Materials; page 1346 page 1347, last paragraph	1-84
X	----- WO 2012/076670 A2 (NOVARTIS AG [CH]; COSENZA MARTA [CH]; HEUSSER CHRISTOPH [CH]; NEUGEBAU) 14 June 2012 (2012-06-14)	1-9, 12-18, 27-42, 50-64, 66-70, 79-84
Y	tables 3,4,5,6,7,11 examples	1-84
Y	----- GR NIREESHA ET AL: "VOLUME 3   NUMBER 4   OCT   2013 Lyophilization/Freeze Drying -An Review", INTERNATIONAL JOURNAL OF NOVEL TRENDS IN PHARMACEUTICAL SCIENCES (IJNTPS, vol. 3, no. 4, 1 January 2013 (2013-01-01) , pages 87-98, XP055227935, page 89, paragraph 2	1-84
X	----- WO 97/04801 A1 (GENENTECH INC [US]) 13 February 1997 (1997-02-13)	1-16, 27-40, 50-68, 79-84
Y	tables 1-7 examples 1,2 claims	1-84
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/055651

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010148337 A1	23-12-2010	AU 2010263058 A1	12-01-2012
		CA 2764180 A1	23-12-2010
		CN 102695499 A	26-09-2012
		EP 2442798 A1	25-04-2012
		JP 2012530721 A	06-12-2012
		KR 20120027031 A	20-03-2012
		RU 2011151286 A	27-07-2013
		US 2012114646 A1	10-05-2012
		WO 2010148337 A1	23-12-2010
WO 2012076670 A2	14-06-2012	EP 2648750 A2	16-10-2013
		US 2014186373 A1	03-07-2014
		US 2016368999 A1	22-12-2016
		WO 2012076670 A2	14-06-2012
WO 9704801 A1	13-02-1997	AR 003969 A1	30-09-1998
		AR 074517 A2	26-01-2011
		AU 716785 B2	09-03-2000
		BR 9609743 A	02-03-1999
		CA 2226575 A1	13-02-1997
		CA 2745743 A1	13-02-1997
		CN 1191490 A	26-08-1998
		CN 1539505 A	27-10-2004
		CN 102416176 A	18-04-2012
		DK 1516628 T3	08-09-2013
		DK 2275119 T3	11-11-2013
		EP 0845997 A1	10-06-1998
		EP 1516628 A1	23-03-2005
		EP 2275119 A1	19-01-2011
		ES 2434840 T3	17-12-2013
		ES 2435462 T3	19-12-2013
		HK 1117075 A1	30-11-2012
		HK 1152876 A1	14-02-2014
		IL 122910 A	23-05-2002
		JP 5043506 B2	10-10-2012
		JP 5043507 B2	10-10-2012
		JP H11510170 A	07-09-1999
		JP 2007217430 A	30-08-2007
		JP 2007238628 A	20-09-2007
		JP 2011256205 A	22-12-2011
		JP 2011256206 A	22-12-2011
		JP 2016033156 A	10-03-2016
		JP 2017039778 A	23-02-2017
		NO 980335 A	26-03-1998
		NO 2007012 I1	29-11-2007
		NZ 313503 A	28-01-2000
		NZ 500539 A	30-11-2001
		PT 1516628 E	24-09-2013
		PT 2275119 E	21-11-2013
		RU 2497500 C2	10-11-2013
		RU 2013141049 A	20-03-2015
SI 1516628 T1	30-10-2013		
SI 2275119 T1	31-12-2013		
WO 9704801 A1	13-02-1997		