

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045889**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.12

(21) Номер заявки
202192475

(22) Дата подачи заявки
2020.04.20

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ ПЕПТИДНЫХ СОСТАВОВ**

(31) **62/839,246**

(32) **2019.04.26**

(33) **US**

(43) **2022.01.28**

(86) **PCT/US2020/028988**

(87) **WO 2020/219391 2020.10.29**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМФАСТАР ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Браун Грегори Нельсон, Ван Скойк
Курт Гард (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.
(RU)**

(56) **WO-A1-2016133863**

The Protein Man: "Tips for Preventing Protein Aggregation & Loss of Protein Solubility", 29 January 2019 (2019-01-29), pages 1-5, XP055711454, Retrieved from the Internet: URL:<https://info.gbiosciences.com/blog/tips-for-preventing-protein-aggregation-loss-of-protein-solubility>, [retrieved on 2020-07-03], pages 1-2

US-A1-2003146156

(57) В изобретении предложен улучшенный способ получения порошкообразного состава, содержащего пептид. Кроме того, в изобретении предложен улучшенный способ получения порошкообразного состава, содержащего глюкагон или аналог глюкагона, при этом указанный порошкообразный состав подходит для назального введения.

B1

045889

045889

B1

Изобретение относится к области медицины. Более конкретно, в настоящем изобретении предложен улучшенный способ получения порошкообразного состава, содержащего пептид. Кроме того, в настоящем изобретении предложен улучшенный способ получения порошкообразного состава, содержащего глюкагон или аналог глюкагона, при этом указанный порошкообразный состав подходит для назального введения.

Во время и после процесса получения пептиды проявляют склонность к физической нестабильности, такой как агрегация. Агрегация представляет собой сложный процесс, в основе которого лежат несколько различных механизмов. Агрегация обычно может быть вызвана нуклеацией нескольких пептидов или белков, которые образуют небольшие и растворимые агрегаты; затем такие агрегаты служат центрами нуклеации для последующего роста более крупных нерастворимых агрегатов. Процесс нуклеации-роста может усиливаться со временем, температурой, концентрацией белка и другими параметрами. Во время получения белки очищают и концентрируют с применением различных средств, таких как ультрафильтрация, аффинная хроматография, селективная абсорбционная хроматография, ионообменная хроматография, лиофилизация, диализ и осаждение или "высаливание". Такие способы концентрации могут привести к агрегации (Maggio, BioProcess International 2008; 6(10): 58-65). Удаление или растворение указанных агрегатов требует дополнительных технологических стадий, которые могут быть дорогостоящими и могут негативно сказаться на общем выходе продукта. Эффекты агрегации могут включать потерю материала, снижение эффективности, изменение фармакокинетики, уменьшение стабильности и срока годности продукта, а также индуцирование нежелательной иммуногенности.

Агрегация стала серьезной проблемой для производителей биофармацевтических препаратов, в частности, потому что текущая тенденция к применению растворов с высокой концентрацией увеличивает вероятность белок-белковых взаимодействий, что, в свою очередь, способствует агрегации. (Maggio, BioProcess International 2008; 6(10): 58-65). Были изучены различные подходы к ограничению агрегации пептида, в том числе, но не ограничиваясь ими, регулирование: pH, буферных условий, ионной силы и/или добавления других вспомогательных веществ, таких как циклодекстрины.

Глюкагон известен своей склонностью к агрегации в водных растворах (Pedersen JS., J Diabetes Sci Technol. 2010; 4(6): 1357-1367; Beaven et al., The European J. Biochem. 1969; 11(1): 37-42; Matilainen et al., European J. of Pharmaceutical Sciences 2009; (36): 412-420), что может вызывать проблемы при производстве порошкообразных составов глюкагона. Предыдущие способы получения порошкообразных составов глюкагона, подходящих для назального введения, описаны в WO2016/133863.

Существует потребность в альтернативных способах получения пептидных порошкообразных составов, в частности, порошкообразных составов глюкагона или аналога глюкагона. В частности, необходимы способы, которые уменьшают или устраняют агрегацию пептида в водном растворе. За счет уменьшения или предпочтительно устранения агрегации конечный порошкообразный состав будет сохранять очень высокий процент активного пептида, что является крайне выгодным. Такой способ предпочтительно приводит к получению водного раствора перед сушкой, который является физически и химически стабильным в течение продолжительного периода времени, например, до 24 часов. Такая повышенная стабильность делает указанный способ более пригодным для крупномасштабного производства. Кроме того, существует потребность в способе, который позволяет получать конечный порошкообразный состав с длительным сроком хранения, предпочтительно примерно до 24 месяцев.

Соответственно, в настоящем изобретении предложен улучшенный и экономически выгодный способ уменьшения агрегации пептида во время производства порошкообразного состава. Указанный способ включает стадию двукратной фильтрации. Одним из таких пептидов, применяемых в настоящем изобретении, является глюкагон или аналог глюкагона. Порошкообразные составы, полученные в соответствии с настоящим способом, особенно подходят для назального введения.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложен способ получения пептидного порошкообразного состава. Предложенный способ включает стадии:

- a. получения первой смеси кислоты, фосфолипидного поверхностно-активного вещества и циклодекстрина в водном носителе;
- b. воздействия на первую смесь первой стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм;
- c. добавления пептида к первому продукту фильтрации с получением второй смеси и воздействия на вторую смесь второй стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм; и
- d. сушки второго продукта фильтрации с получением твердого состава и обработки твердого состава с получением конечного порошкообразного состава.

Согласно одному из вариантов реализации пептид представляет собой глюкагон или аналог глюкагона. В частности, он представляет собой глюкагон.

Согласно одному из вариантов реализации кислота представляет собой лимонную кислоту или уксусную кислоту. В частности, она представляет собой уксусную кислоту. Более конкретно, уксусная кислота присутствует в концентрации 1M.

Согласно одному из вариантов реализации поверхностно-активное вещество, циклодекстрин и пеп-

тид вместе составляют от примерно 1,5% до примерно 3% по массе относительно массы второй смеси. Согласно конкретному варианту они составляют примерно 2% по массе относительно массы второй смеси. Согласно другому варианту они составляют примерно 2,5% по массе относительно массы второй смеси.

Согласно одному из вариантов реализации поверхностно-активное вещество представляет собой додецилфосфохолин (DPC), дидецилфосфатидилхолин (DDPC), лизолауроилфосфатидилхолин (LLPC), диоктаноилфосфатидилхолин (D8PC) или дилауроилфосфатидилглицерин (DLPG). В частности, поверхностно-активное вещество представляет собой DPC.

Согласно одному из вариантов реализации циклодекстрин представляет собой α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин или γ -циклодекстрин. В частности, циклодекстрин представляет собой β -циклодекстрин.

Согласно одному из вариантов реализации более 98% пептида в конечном порошкообразном составе представляет собой неагрегированный пептид согласно измерениям с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Предпочтительно, более 99% пептида представляет собой неагрегированный пептид. Более предпочтительно, 100% пептида представляет собой неагрегированный пептид.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения пептидного порошкообразного состава, включающий стадии:

- a. получения первой смеси фосфолипидного поверхностно-активного вещества и циклодекстрина в водном носителе;
- b. воздействия на первую смесь первой стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм;
- c. добавления пептида к первому продукту фильтрации с получением второй смеси и воздействия на вторую смесь второй стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм; и
- d. сушки второго продукта фильтрации с получением твердого состава и обработки твердого состава с получением конечного порошкообразного состава.

Согласно одному из вариантов реализации поверхностно-активное вещество, циклодекстрин и пептид вместе составляют от примерно 1,5% до примерно 3% по массе относительно массы второй смеси. Согласно конкретному варианту они составляют примерно 2% по массе относительно массы второй смеси. Согласно другому варианту они составляют примерно 2,5% по массе относительно массы второй смеси.

Согласно одному из вариантов реализации поверхностно-активное вещество представляет собой DPC, DDPC, LLPC, D8PC или DLPG. В частности, поверхностно-активное вещество представляет собой DPC.

Согласно одному из вариантов реализации циклодекстрин представляет собой α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин или γ -циклодекстрин. В частности, циклодекстрин представляет собой β -циклодекстрин.

Согласно одному из вариантов реализации более 98% пептида в конечном порошкообразном составе представляет собой неагрегированный пептид согласно измерениям с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Предпочтительно, более 99% пептида представляет собой неагрегированный пептид. Более предпочтительно, 100% пептида представляет собой неагрегированный пептид.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения порошкообразного состава глюкагона, включающий стадии:

- a. получения первой смеси уксусной кислоты, DPC и β -циклодекстрина в водном носителе;
- b. воздействия на первую смесь первой стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм;
- c. добавления глюкагона к первому продукту фильтрации с получением второй смеси и воздействия на вторую смесь второй стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от примерно 0,4 мкм до примерно 0,5 мкм; и
- d. сушки второго продукта фильтрации с получением твердого состава и обработки твердого состава с получением конечного порошкообразного состава.

Согласно одному из вариантов реализации глюкагон, DPC и β -циклодекстрин вместе составляют от примерно 1,5% до примерно 3% по массе относительно массы второй смеси. Согласно конкретному варианту они составляют примерно 2% по массе относительно массы второй смеси. Согласно другому варианту они составляют примерно 2,5% по массе относительно массы второй смеси.

Согласно одному из вариантов реализации уксусная кислота присутствует в концентрации 1M.

Согласно одному из вариантов реализации более 98% глюкагона в конечном порошкообразном составе составляет неагрегированный глюкагон, как было измерено с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Предпочтительно, более 99% глюкагона представляет собой неагрегированный глюкагон. Более предпочтительно, 100% глюкагона представляет собой неагрегированный глюкагон.

В настоящем изобретении также предложен порошкообразный состав, полученный согласно способу, предложенному в настоящем изобретении.

Согласно конкретным вариантам реализации сушку второго продукта фильтрации можно осуществлять посредством сублимационной сушки (лиофилизации) или распылительной сушки.

Согласно конкретному варианту реализации фильтрующая мембрана, как на первой, так и на второй стадии фильтрации, содержит, но не ограничивается ими, поливинилидендифторид (PVDF), ацетат целлюлозы, нитрат целлюлозы, политетрафторэтилен (PTFE, тефлон), поливинилхлорид, полиэфирсульфон или другие фильтрующие материалы, подходящие для применения в производственной среде, содержащей cGMP. Согласно предпочтительному варианту реализации фильтрующая мембрана содержит PVDF.

Согласно конкретному варианту реализации фильтрующая мембрана, как на первой, так и на второй стадии фильтрации, представляет собой мембрану с размером пор примерно 0,45 мкм. Согласно предпочтительному варианту реализации фильтрующая мембрана представляет собой мембрану из PVDF с размером пор 0,45 мкм.

Согласно одному из вариантов реализации pH раствора во время осуществления способа, предложенного в настоящем изобретении, поддерживают на уровне от 2 до 3.

Согласно одному из вариантов реализации фазу растворения в способе, предложенном в настоящем изобретении, проводят при температуре от 15 до 30°C, предпочтительно от 18 до 25°C, более предпочтительно примерно 20°C.

Способы согласно настоящему изобретению можно использовать для пептидов, которые проявляют склонность к агрегации во время производства порошкообразного состава. В частности, указанные способы можно использовать для пептидов, включающих, помимо прочего, амилин, аналоги амилина, рекомбинантный человеческий фактор VIII (rfVII), пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP), кальцитонин, аналоги GLP-1, двойные агонисты GLP-1-GLP, агонисты GIP, рекомбинантный человеческий гормон роста (rhGH), ингибитор октапептид CCR5, D-Ala-пептид Т-амид, рекомбинантный человеческий инсулин, аналоги инсулина, аналоги циклических пептидов PTH 1-31, интерферон-β, интерфероны β-1a и β-1b, интерлейкин-2 (IL-2), эритропоэтин (EPO), ацетат прамлинтида и ферменты, такие как урокиназа.

В частности, способы согласно настоящему изобретению можно использовать для получения порошкообразного состава глюкагона. Глюкагон является высокоэффективным средством лечения тяжелой гипогликемии, как за пределами, так и в условиях стационара. Глюкагон выпускают в виде порошкообразных составов, которые необходимо смешивать с разбавителем непосредственно перед введением путем инъекции. Также известны жидкие составы глюкагона (Pontiroli et al., Br Med J (Clin Res Ed) 1983; 287: 462-463). Порошок глюкагона для назального введения для лечения тяжелой гипогликемии был разработан и описан в WO2016/133863, недавно он был одобрен в США и Европе под названием Baqsimi™.

Составы глюкагона или аналогов глюкагона, полученные согласно способам, предложенным в настоящем изобретении, особенно подходят для назального введения. Согласно предпочтительным вариантам реализации составы, полученные в соответствии со способами, предложенными в настоящем изобретении, имеют одно или более из следующих свойств:

- низкую долю мелких частиц, которые могут попасть в легкие;
- достаточное содержание препарата для обеспечения общей дозы препарата, необходимой для достижения терапевтического эффекта, в виде однократной дозы, вводимой в одну ноздрю;
- достаточное содержание препарата для доставки общей дозы в несколько десятков миллиграммов или максимальной дозы, допустимой данным устройством доставки;
- достаточное содержание препарата и подходящие характеристики абсорбции для обеспечения эффективности, несмотря на заложенность носа, которая может быть связана с аллергией или простудой;
- стабильность при хранении в условиях окружающей среды в течение длительного периода времени, предпочтительно не менее 24 месяцев;
- хороший профиль безопасности и переносимости.

В настоящем документе термин "агрегация" относится к накоплению, слипанию, агломерации, димеризации, полимеризации или образованию ядер зародышей, центров нуклеации, фибрилл или гелей, состоящих из небольших олигомерных предшественников, таких как пептиды. Размер агрегатов варьирует от растворимых димеров и других мультимеров (кажущийся диаметр глобул приблизительно от 5 до 10 нм) до более крупных нерастворимых частиц, идентифицированных как невидимые невооруженным глазом и видимые частицы (кажущийся диаметр глобул приблизительно от 20 до 50 мкм). Из группы растворимых агрегатов более крупные агрегаты, такие как высокомолекулярные соединения, могут быть способны вызывать иммуногенные реакции, которые могут иметь неблагоприятный клинический исход.

В настоящем документе термины "ядра зародышей" или "центры нуклеации" относятся к наименьшему размеру агрегатов, из которых образуются более крупные агрегаты.

Обращенно-фазовую ВЭЖХ можно использовать для определения количества неагрегированного пептида в конечном порошкообразном составе. Можно использовать стандартные условия, известные специалистам в данной области, например, те, которые описаны ниже в примерах.

В настоящем документе термин "глюкагон" относится к полипептиду последовательности:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1).

Глюкагон можно синтезировать химическим путем, получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК или экстрагировать из природных источников. Термин "аналог глюкагона" относится к вариантам приведенной последовательности, которые сохраняют способность стимулировать повышение уровня глюкозы в крови *in vivo*.

Примеры аналогов глюкагона, в которых одна аминокислота из природной последовательности заменена на аланин, а также аналоги с множественными заменами описаны в Chabenne et al., *Molecular Metabolism* 2014; 3: 293-300. Примером аналога, в котором три аминокислоты модифицированы с получением аналога глюкагона с повышенной биологической активностью, является глюкагон [Lys^{17,18}, Glu²¹]. Компанией Zealand Pharma было описано множество аналогов глюкагона, например, в патентных публикациях США 20140080757, 2014001733, 20130316941, 20130157935, 20130157929, 20120178670, 20110293586, 20110286982, 20110286981 и 20100204105. Как сообщается, такие аналоги имеют большую связывающую аффинность к рецептору GLP, чем к рецептору глюкагона, но тем не менее сохраняют активность глюкагона. В Zealand Pharma также начались клинические испытания аналога глюкагона для лечения гипогликемии, обозначенного как ZP4207. В публикации патента США 20130053310 описаны и другие аналоги глюкагона, применимые для лечения гипогликемии.

Фосфолипидные поверхностно-активные вещества представляют собой широко распространенные компоненты биологических мембран, которые являются частью клеток и тканей в организме человека, в том числе слизистой оболочке носа. Наиболее распространенными фосфолипидными поверхностно-активными веществами в клетках являются фосфатидилхолины и фосфохолины (PC), хотя фосфатидилглицерины (PG) являются важными компонентами биологических мембран. Также можно использовать лизофосфолипиды, полученные из диацил-PC или PG путем удаления одной из ацильных групп.

Типичные фосфолипидные поверхностно-активные вещества, которые можно использовать в настоящем изобретении, представляют собой додецилфосфохолин (DPC), дидецилфосфатидилхолин (DDPC или 1,2-дидецил-sn-глицеро-3-фосфохолин), лизолауроилфосфатидилхолин (LLPC или 1-дидеканоил-sn-глицеро-3-фосфохолин), диоктаноилфосфатидилхолин (D8PC или 1,2-диоктаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин) и дилауроилфосфатидилглицерин (DLPG или 1,2-дилауроил-sn-глицеро-3-фосфо(1'-гас-глицерин)).

Предпочтительными фосфолипидными поверхностно-активными веществами являются вещества, образующие мицеллы, а не двойные слои, в концентрации, применяемой при производстве порошкообразного состава. Такие вещества включают DPC, DDPC, LLPC и D8PC, но не DLPG. Наиболее предпочтительным является DPC.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения используют один тип фосфолипидного поверхностно-активного вещества. Согласно другим вариантам реализации фосфолипидный поверхностно-активный компонент может быть составлен из смесей фосфолипидных поверхностно-активных веществ, в том числе, например, комбинации любых двух, трех или четырех поверхностно-активных веществ, перечисленных выше.

В настоящем документе термин "циклодекстрин" относится к циклодекстрину, содержащему шесть, семь или восемь остатков глюкозы в кольце, образующем конусообразную форму, а именно:

α (альфа)-циклодекстрину: 6-членная кольцевая молекула сахара;

β (бета)-циклодекстрину: 7-членная кольцевая молекула сахара;

γ (гамма)-циклодекстрину: 8-членная кольцевая молекула сахара.

α-Циклодекстрин использовали в клинических испытаниях в порошкообразном составе (HypoGon® (ГипоГон) Nasal) от компании Novo Nordisk (Stenniger et al, *Diabetologia* 1993; 36: 931-935; Rosenfalck AM, et al, *Diabetes Res Clin Pract* 1992; 17: 43-50). Сообщается, что растворимость α-циклодекстрина в воде составляет примерно 5 мас. %.

Два других циклодекстрина, один с растворимостью в воде ниже растворимости α-циклодекстрина (β-циклодекстрин, 1,85 мас. %), и другой с более высокой растворимостью в воде, чем растворимость α-циклодекстрина (гидроксипропил-β-циклодекстрин), также подходят для применения в настоящем изобретении, как и γ-циклодекстрин, который легко растворяется в воде.

Циклодекстрины в предложенном составе действуют как наполнитель, а также прилипают к поверхности слизистой оболочки носа и способствуют абсорбции глюкагона. При доставке в носовую полость основной ингредиент (от 90% до 70% по массе), а именно циклодекстрин, помогает порошку прилипать к поверхности слизистой оболочки.

Циклодекстрины можно использовать по отдельности или в виде смесей любых двух или более циклодекстринов.

Согласно конкретному варианту реализации порошкообразный состав глюкагона, полученный в соответствии с настоящим способом, содержит глюкагон, DPC и β-циклодекстрин. Указанный порошкообразный состав предпочтительно содержит глюкагон, DPC и β-циклодекстрин в массовом отношении

10:10:80 (глюкагон:ВРС:β-циклодекстрин). Глюкагон предпочтительно присутствует в терапевтическом количестве, которое эффективно при введении в однократной дозе в одну ноздрю. Согласно одному из вариантов реализации доза глюкагона составляет примерно 3 мг.

Смешивание можно осуществлять способами, включающими статическое и динамическое перемешивание. Динамическое перемешивание можно выполнять путем применения вставленной в жидкость лопасти, которая прикреплена к валу и вращается с помощью двигателя. Статическое перемешивание можно выполнять путем пропускания жидкости по извилистому пути внутри статического смесителя. Наличие границы раздела воздух-вода во время перемешивания в условиях высокой скорости перемешивания может привести к вспениванию. Высокоскоростное перемешивание также может, в свою очередь, привести к дестабилизации белка вследствие напряжения сдвига. Для минимизации пенообразования и предпочтительно его устранения, предпочтительными являются условия перемешивания с низкой скоростью. В случае динамического перемешивания скорость определяется числом оборотов мешалки в минуту (об/мин). Предпочтительные значения об/мин составляют от 50 до 300, более предпочтительно от 50 до 250, еще больше предпочтительно от 50 до 100.

Второй продукт фильтрации высушивают для удаления растворителя и получения твердого продукта. Сушку можно осуществлять с помощью сублимационной сушки, распылительной сушки, сушки на лотке или другими способами. Макроскопические физические характеристики продукта будут меняться в зависимости от технологии сушки, при этом полученный продукт может быть в форме хлопьевидного твердого вещества при сублимационной сушке или высушенного твердого осадка.

Порошки с чрезмерным содержанием влаги могут быть липкими и образовывать комки, что приводит к получению порошка, которым трудно манипулировать при заполнении устройства для введения. Важно отметить, что уровень остаточного содержания воды непосредственно влияет на стабильность. Уровни остаточной влажности, превышающие 5% в сыпучем порошке, приводят к снижению стабильности по сравнению с порошком с остаточным содержанием воды ниже 5%. Следовательно, согласно конкретному варианту реализации остаточное содержание воды в порошкообразных составах, полученных в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно составляет менее 5%.

Согласно конкретному варианту реализации количество кислоты в порошкообразных составах, полученных в соответствии с настоящим изобретением, составляет менее 10% мас./мас., предпочтительно менее 6% мас./мас.

Подходящие порошки для назального введения требуют физических характеристик, которые обеспечивают достаточную текучесть, позволяющую заполнить ими устройство для выделений из носа. Текучесть определяется различными параметрами, в том числе размером частиц, формой, плотностью, текстурой поверхности, площадью поверхности, плотностью, когезией, адгезией, эластичностью, пористостью, гигроскопичностью и хрупкостью.

Порошки с подходящим размером частиц и характеристиками текучести можно получить путем обработки сыпучего порошка для удаления слишком маленьких или слишком крупных частиц. Способы обработки сыпучего порошка для удаления слишком маленьких или слишком крупных частиц могут включать измельчение сыпучего порошка для разрушения более крупных частиц и просеивание для выделения частиц с размером требуемого диапазона. Можно использовать различные способы просеивания, в том числе просеивание путем вибрации в вертикальном направлении (throw-action sieving), горизонтальное просеивание, просеивание путем постукивания, ультразвуковое просеивание и просеивание с помощью струи воздуха круглого сечения. Сита можно использовать в виде одиночных сит с фиксированным номинальным отверстием, или сыпучий порошок можно пропускать через серию сит с постепенно уменьшающимися отверстиями с получением требуемого распределения частиц по размерам. Сита могут представлять собой сита из тканой проволочной сетки с номинальным размером отверстий в диапазоне от 25 до 1000 мкм.

Примеры

Пример 1 - Получение порошкообразного состава глюкагона - стадия двукратной фильтрации

DPC растворяли в 1 М растворе уксусной кислоты при перемешивании. Затем к раствору DPC добавляли β-циклодекстрин и перемешивали до растворения с получением первого раствора. Первый раствор подвергали первой стадии фильтрации через фильтр из PVDF с размером отверстий 0,45 мкм. Продукт фильтрации (вспомогательный раствор) собирали в новый чистый резервуар, и доводили температуру резервуара до 20°C ± 2°C для обеспечения растворимости веществ в растворе. После достижения в резервуаре заданной температуры в резервуар добавляли глюкагон или аналог глюкагона при одновременном перемешивании раствора. Как только, по всей видимости, глюкагон растворился (подтверждено визуально), перемешивание немедленно прекращали. Затем раствор глюкагона фильтровали через второй фильтр из PVDF с размером отверстий 0,45 мкм, и собирали фильтровальный материал во втором чистом резервуаре. Такой второй фильтровальный материал (второй продукт фильтрации) содержал 97,5% мас./мас. 1М водного раствора уксусной кислоты, 0,25 мас.% DPC, 2 мас.% β-циклодекстрина и 0,25% мас./мас., глюкагона (всего 2,5% мас./мас., твердых веществ по массе). Затем материал лиофилизировали и подвергали стадии уплотнения с получением конечного порошкообразного состава глюкаго-

на.

Сравнительный пример - Получение порошкообразного состава глюкогона - стадия однократной фильтрации

DPC растворяли в 1 М растворе уксусной кислоты (8 литров) при перемешивании. Добавляли глюкогон при одновременном перемешивании раствора. Как только, по всей видимости, глюкогон растворился (подтверждено визуально) добавляли при перемешивании β -циклодекстрин. После того как все добавленные твердые вещества, по всей видимости, растворились, раствор фильтровали через фильтр из PVDF с размером отверстий 0,45 мкм. При засорении или загрязнении мембраны одного фильтра может потребоваться применение нескольких фильтров. Отфильтрованный материал содержал 0,3% мас./мас. DPC, 2,4% мас./мас. β -циклодекстрина и 0,3% мас./мас., глюкогона (всего 3% мас./мас., твердых веществ). Отфильтрованный материал собирали и лиофилизировали.

Стабильность вспомогательного раствора после первой фильтрации

Вспомогательный раствор (уксусная кислота, DPC и β -циклодекстрин) получали по существу, как описано в примере 1, при концентрации твердых веществ 2,5% мас./мас. Раствор выдерживали при 25°C в течение всего периода исследования. Полученные данные суммированы в табл. 1. Никаких значительных изменений в содержании в течение 22-часового периода не произошло, и баланс массы был подтвержден.

Таблица 1

Образец время, часы	Содержание DPC (% масс./масс.)	Содержание β - циклодекстрина (% масс.)
0	0,26	2,02
1	0,26	2,00
2,7	0,26	2,05
3,2	0,26	1,97
7,4	0,25	1,96
22	0,25	1,98

Стабильность водного раствора, содержащего глюкогон

Анализ раствора

Раствор глюкогона получали, как описано в примере 1 (второй продукт фильтрации). После получения раствор глюкогона оставляли отстаиваться без перемешивания. Пробы раствора отбирали в заранее определенное время и перед анализом пропускали через фильтр с размером отверстий 0,45 мкм. На данной стадии фильтрации был удален любой глюкогон, превратившийся в агрегаты, поэтому такой анализ позволил оценить степень агрегации.

Флуоресцентный анализ

В основе способа флуоресценции лежит применение сдвига длины волны излучения одного остатка триптофана в молекуле глюкогона (Pedersen JS., J Diabetes Sci Technol. 2010; 4(6): 1357-1367). При изменении конформации молекулы глюкогона от случайного клубка или альфа-спирали до агрегированных форм локальное окружение молекулы триптофана изменяется, что приводит к коротковолновому смещению спектра излучения. Таким образом, контролируя изменение длины волны сигнала флуоресцентного излучения глюкогона во времени с помощью волоконно-оптического флуоресцентного зонда обратного рассеяния, можно использовать расчет отношения пиков излучения неагрегированного глюкогона к агрегированным формам молекулы в качестве инструмента для отслеживания агрегации в реальном времени.

Раствор глюкогона получали по существу, как описано в примере 1 (второй продукт фильтрации). Флуоресцентный зонд использовали для мониторинга изменений спектров излучения со временем. Раствор не перемешивали и контролировали при комнатной температуре в течение 24 часов.

В небольшом эксперименте (100 мл) в течение такого 24-часового периода не наблюдалось никакого изменения отношения пиков флуоресценции глюкогона.

В дальнейших экспериментах раствор глюкогона получали по существу, как описано в примере 1 (второй продукт фильтрации), и выдерживали при различных температурах. С целью сравнения его сравнивали с раствором глюкогона, который не подвергался стадии с применением второго фильтра. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исследования фильтрации и температуры выдерживания раствора глюкогона

Эксперименты	Фильтрация	Температура выдерживания, время	Перемешивание	Результаты
А	Да	20 °С, 24 часа	Нет	Без изменений при анализе раствора глюкогона
В	Да	5 °С, 24 часа	Нет	Без изменений при анализе раствора глюкогона
С	Нет	20 °С, 24 часа	Нет	Потери при анализе раствора глюкогона; Изменение соотношения пиков флуоресцентного излучения

Результаты исследования показали, что при прохождении раствором глюкогона стадии с применением второго фильтра и выдерживании его без перемешивания при температуре 5°C или 20°C не происходит потери глюкогона из системы в результате агрегации. Однако, когда раствор не подвергался фильтрации, он терял примерно 8% своего содержания глюкогона в течение 24 часов.

Химическую стабильность раствора глюкогона, полученного по существу, как указано в примере 1, также можно исследовать с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, по существу, как описано ниже.

При применении способов получения, осуществляемых по существу, как описано выше, с использованием двукратной фильтрации в количествах до 100 литров (с 2,5 мас.% твердых веществ) неожиданно было обнаружено, что раствор, собранный после второй стадии фильтрации, был физически и химически стабильным в течение до 24 часов без какой-либо обнаруживаемой агрегации (как определено с применением одного или более из способов, описанных выше). В то же время материал раствора глюкогона, подвергаемый только одной стадии фильтрации (сравнительный пример - 8 литров и 3% мас./мас., твердых веществ), продемонстрировал видимую агрегацию в пределах примерно 15 минут после добавления глюкогона.

Анализ химической стабильности назального порошкообразного состава глюкогона с помощью ВЭЖХ

Стабильность назального порошкообразного состава глюкогона, полученного в соответствии с примером 1, относительно внешних хорошо охарактеризованных стандартных образцов определяли с применением обычных способов ОФ-ВЭЖХ. Вкратце, использовали колонку С18 для обращенно-фазовой ВЭЖХ, внутренний диаметр 3,0 мм × 150 мм, размер частиц 2,6 мкм, с применением подвижной фазой калий-фосфатный буфер:ацетонитрил при длине волны УФ-детектирования 214 нм. Использовали следующий градиент состава подвижной фазы: вначале выдерживали в течение 3 минут при 54%, 150 мМ калий-фосфатный буфер:ацетонитрил 80:20 и завершали при 70%, состав калий-фосфатный буфер:ацетонитрил 60:40 в течение 8 минут.

В экспериментах, проводимых по существу, как описано выше и показано в табл. 3, репрезентативные образцы из трех различных партий назального порошкообразного состава глюкогона, полученного согласно примеру 1 (100 л), сохраняли примерно 100% активность глюкогона в пределах экспериментальной погрешности.

Биологический анализ активности назального порошкообразного состава глюкогона

Линию эмбриональных клеток почек, НЕК293, сконструированную для стабильной экспрессии как рецептора клеточной поверхности для глюкогона, так и репортерного гена CRE-люциферазы, использовали для определения относительной активности конечного продукта в виде назального состава глюкогона. При таком клеточном анализе транскрипцию люциферазы из CRE-промотора регулировали путем инициирования ответа по сигнальному пути эндогенного циклического аденозинмонофосфата (сAMP). Таким образом, связывание глюкогона с рецептором клеточной поверхности вызывало продуцирование сAMP. Это приводило к фосфорилированию и активации белка, связывающего сAMP-чувствительный элемент (CREB), что вызывало экспрессию люциферазы посредством репортерного гена CRE-люциферазы. Продуцирование люциферазы определяли путем добавления в реакционную смесь субстрата люциферина и количественного определения окисления люциферина с помощью люминометра. Сигнал люминесценции пропорционален количеству присутствующей люциферазы, которое прямо пропорционально количеству глюкогона, применяемого для индукции клеток. Относительную активность исследуемого образца определяли путем сравнения типичной 8-точечной кривой зависимости "доза-ответ" для стандартного образца с кривой для исследуемого образца. Данные об ответе соответствовали 4-параметрической логистической модели, применяемой для определения EC₅₀ стандартного образца и EC₅₀ исследуемого образца, при этом соотношение между указанными значениями EC₅₀ представляло

собой относительную активность исследуемого материала.

Клетки НЕК293 высевали на 96-луночные планшеты для культивирования клеток в питательной среде (10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей 1,0 мг/мл Genetecin® (Генетецина) и 125 мкг/мл гигромицина В. Можно было добавить пенициллин и стрептомицин в конечной концентрации 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и оставляли прикрепляться в течение от 30 минут до 2,5 часов при 37°C. Питательную среду промывали и заменяли средой для анализа, состоящей из 0,25% FBS в DMEM, содержащей 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 1 × пенициллин/стрептомицин и глюкагон в концентрациях от 0,00032 нг/мл до 25 нг/мл. Планшеты инкубировали в течение 4,5 часа при 37°C. Добавляли 100 мкл SteadyGlo® (СтедиГло) на лунку, и затем лунки непрерывно перемешивали в течение 30 минут при температуре окружающей среды. Планшеты считывали на люцинометре.

Было обнаружено, что в экспериментах, проведенных по существу, как описано выше и показано в табл. 3, относительная активность глюкагона в процентах, измеренная с помощью клеточного анализа, составляла от 94% до 102%, что демонстрирует отсутствие агрегации во время получения состава согласно примеру 1 (100 л). Такие результаты были сопоставимы с результатами химического анализа глюкагона при применении того же стандартного образца.

Анализ примесей в назальном порошкообразном составе глюкагона

Идентификацию и количественное определение потенциальных примесей в назальном порошкообразном составе глюкагона проводили с применением обычных способов ОФ-ВЭЖХ. Примеси могут возникнуть вследствие производственного процесса или химического разложения веществ в конечном составе. Данный способ основан на условиях, описанных в USP41-NF36. С помощью такого анализа определяли показатель стабильности порошкообразного состава глюкагона.

В экспериментах, проведенных по существу, как описано выше и показано в табл. 3, общее содержание примесей при выпуске партии составляло от примерно 0,4% до примерно 0,56%. Кроме того, согласно предложенному анализу спецификации на срок годности для назального порошкообразного состава глюкагона, полученного в соответствии с примером 1, общий уровень примесей составлял примерно 20% (a/a) или ниже в течение до примерно 24 месяцев. Неожиданно оказалось, что общий уровень примесей в назальном порошкообразном составе глюкагона значительно ниже, чем рекомендованный для текущих имеющихся в продаже глюкагон-содержащих наборов для оказания экстренной помощи, для которых в действующей монографии Фармакопеи США (USP41-NF36) указан предел не более 31% (a/a) от общего количества присутствующих примесей и родственных соединений.

Таблица 3

Химическая стабильность, биологический анализ и анализ примесей назального порошкообразного состава глюкагона

Партия №	Химический анализ глюкагона (%)	Биологический анализ глюкагона (относительная активность, %)	Общее содержание примесей (%)
1	103,1	102	0,40
2	101,1	94	0,39
3	102,1	97	0,56

Приведенные выше данные относятся к партиям порошкообразного состава, которые были загружены в устройство для назальной доставки и затем выгружены.

Клиническая эффективность назального порошкообразного состава глюкагона

В клиническом исследовании NCT03339453 была изучена клиническая эффективность назального порошкообразного состава глюкагона из крупномасштабной производственной партии контролируемого качества с применением двухстадийного процесса фильтрации согласно примеру 1 (Suico et al., EASD-2008; abstract 150). Вкратце, эффективность и безопасность назального порошкообразного состава глюкагона (NG) сравнивали с вводимым внутримышечно глюкагоном (IMG) для взрослых пациентов с сахарным диабетом 1 типа во время контролируемой инсулин-индуцированной гипогликемии. Назальный порошкообразный состав глюкагона был упакован в устройство для доставки в одну ноздрю с дозой 3,0 мг.

Результаты, представленные в табл. 4, продемонстрировали, что 100% пациентов успешно лечились путем применения либо NG, либо IMG, и что в данном исследовании активность NG сравнима с активностью IMG.

Таблица 4

	Первичный анализ эффективности IGBI (TID) (N = 66) ^a	
	NG 3 мг	IMG 1 мг
Успех лечения - n (%)	66 (100%)	66 (100%)
Разница между методами лечения (двусторонний 95% доверительный интервал) ^b	0% (-1,5%, 1,55) ^c	
Соблюдение критерия глюкогона - n (5)		
(i) ≥ 70 мг/дл (3,9 ммоль/л)	66 (100%)	66 (100%)
(ii) Увеличение на ≥ 20 мг/дл (1,1 ммоль/л) от самого низкого уровня	66 (100%)	66 (100%)
Как (i), так и (ii)	66 (100%)	66 (100%)

^a В популяции для анализа эффективности были включены все пациенты, которые получали обе дозы исследуемого препарата с подходящими концентрациями глюкозы.

^b Разницу рассчитывали как (процент успешных результатов при применении IMG) - (процент успешных результатов при применении NG), не уменьшая эффективность.

^c Двусторонний 95% доверительный интервал (CI) согласно способу Вальда с поправкой на непрерывность.

Последовательности:

(SEQIDNO: 1)

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения пептидного порошкообразного состава, включающий стадии:

a. получения первой смеси кислоты, фосфолипидного поверхностно-активного вещества и циклодекстрина в водном носителе;

b. воздействия на первую смесь первой стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от 0,4 мкм до 0,5 мкм;

c. добавления пептида к первому продукту фильтрации с получением второй смеси и воздействия на вторую смесь второй стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от 0,4 мкм до 0,5 мкм; и

d. сушки второго продукта фильтрации с получением твердого состава и обработки твердого состава с получением конечного порошкообразного состава,

где пептид представляет собой глюкагон или аналог глюкагона,

где кислота представляет собой лимонную кислоту или уксусную кислоту,

где поверхностно-активное вещество представляет собой додецилфосфохолин, дидецилфосфатидилхолин, лизолауроилфосфатидилхолин, диоктаноилфосфатидилхолин или дилауроилфосфатидилглицерин, где циклодекстрин представляет собой α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, гидроксипропил- β -циклодекстрин или γ -циклодекстрин.

2. Способ по п.1, в котором пептид представляет собой глюкагон.

3. Способ по любому из пп.1, 2, в котором поверхностно-активное вещество, циклодекстрин и пептид вместе составляют от 1,5% до 3% по массе относительно массы второй смеси.

4. Способ по п.3, в котором поверхностно-активное вещество, циклодекстрин и пептид вместе составляют 2% по массе относительно массы второй смеси.

5. Способ по п.3, в котором поверхностно-активное вещество, циклодекстрин и пептид вместе составляют 2,5% по массе относительно массы второй смеси.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором мембрана как на первой, так и на второй стадиях фильтрации включает мембрану из поливинилидендифторида (PVDF).

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором мембрана как на первой, так и на второй стадиях фильтрации имеет размер пор 0,45 мкм.

8. Способ по п.1, в котором кислота представляет собой уксусную кислоту.

9. Способ по п.8, в котором уксусная кислота присутствует в концентрации 1М.

10. Способ по п.1, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой додецилфосфо-

холин.

11. Способ по п.1, в котором циклодекстрин представляет собой β -циклодекстрин.
12. Способ по п.1, в котором пептид представляет собой глюкагон, и указанный способ включает стадии:
 - a. получения первой смеси уксусной кислоты, додецилфосфохолина и β -циклодекстрина в водном носителе;
 - b. воздействия на первую смесь первой стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от 0,4 мкм до 0,5 мкм;
 - c. добавления глюкагона к первому продукту фильтрации с получением второй смеси и воздействия на вторую смесь второй стадии фильтрации, на которой фильтр содержит мембрану с размером пор от 0,4 мкм до 0,5 мкм; и
 - d. сушки второго продукта фильтрации с получением твердого состава и обработки твердого состава с получением конечного порошкообразного состава.
13. Способ по п.12, в котором додецилфосфохолин, β -циклодекстрин и глюкагон вместе составляют 2,5% по массе относительно массы второй смеси.
14. Способ по п.12 или 13, в котором мембрана как на первой, так и на второй стадиях фильтрации включает мембрану из PVDF.
15. Способ по любому из пп.12-14, в котором мембрана как на первой, так и на второй стадиях фильтрации имеет размер пор 0,45 мкм.
16. Способ по любому из пп.12-15, в котором уксусная кислота присутствует в концентрации 1М.
17. Порошкообразный состав глюкагона, полученный способом по любому из пп.12-16, содержащий глюкагон, уксусную кислоту, додецилфосфохолин и β -циклодекстрин, в котором более 98% глюкагона в конечном порошкообразном составе представляет собой неагрегированный глюкагон согласно измерениям с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

