

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045982**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.01.24**

(21) Номер заявки  
**202193289**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.05.22**

(51) Int. Cl. **A61K 38/19** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2017.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

(54) **СТАБИЛЬНЫЙ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫЙ СОСТАВ НА ОСНОВЕ G-CSF, СЛИТОГО С ГИБРИДНЫМ Fc**

---

(31) **19177024.7**

(32) **2019.05.28**

(33) **EP**

(43) **2022.02.22**

(86) **PCT/TR2020/050444**

(87) **WO 2020/242419 2020.12.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИЛЬКОГЕН ИЛАЧ САНАЙИ ВЕ  
ТИДЖАРЕТ А.Ш. (TR)**

(72) Изобретатель:  
**Онджель Хатидже, Даглыкоджа  
Эмине Дуйгу, Шахин Адем,  
Чорбаджиоглу Пала Мельтем, Озкан  
Айлин (TR)**

(74) Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

(56) **WO-A1-2018068012  
US-A1-2012276043  
WO-A2-2011090305  
US-A1-2009258017  
WO-A2-2015150968**

**CHANG L ET AL.: "Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 94, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 1445-1455, XP002503132, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20363 abstract Conclusion\***

---

(57) Состав по изобретению предусматривает стабильный лиофилизированный фармацевтический состав, полученный посредством лиофилизации водного препарата, пригодный для введения подкожным (SC) путем, содержащий по меньшей мере 10 мг/мл молекулы Fc, слитого посредством пептидной связи с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF), по меньшей мере одно стабилизирующее средство в виде комбинации трегалозы и сорбита, где весовое соотношение трегалозы и сорбита составляет от 2:1 до 4:1, по меньшей мере одно неионогенное поверхностно-активное вещество на основе полоксамера и ацетатный буфер, при значении pH водного препарата, которое составляет от 3,8 до 5,2.

---

**B1**

**045982**

**045982**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям на основе стабильного лиофилизированного состава, содержащим G-CSF 3<sup>-го</sup> поколения в молекулах гибридного Fc, слитого посредством пептидной связи с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF), которые пригодны для введения, осуществляемого посредством подкожного (SC) пути.

### Уровень техники

Рынок антител и Fc-слитых белков увеличивается с каждым днем. К настоящему времени 74 антитела или Fc-слитых белка одобрены по меньшей мере одним ведущим регулирующим органом, и при этом 11 из них являются Fc-слитыми (Strohl, W.R., Current progress in innovative engineered antibodies. Protein Cell, 2017). Fc-слитые белки состоят из активного ингредиента в структуре белка или пептида и Fc-домена. Таким образом короткий период полувыведения белка или пептида можно увеличить с часов до дней (Wu, B. and Y.N. Sun, Pharmacokinetics of Peptide-Fc fusion proteins. J Pharm Sci, 2014. 103(1): p. 53-64.). Первый коммерциализированный Fc-слитый белок Энбрел®, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в 1998 г. для терапевтического применения при ревматоидном артрите, вошел в 10 самых продаваемых лекарственных средств во всем мире с продажами на сумму 8874 миллиарда долларов в 2016 году. Предполагается, что Fc-слитые белки будут продолжать оказывать огромное влияние на фармацевтическую промышленность в предстоящие годы (Strohl, W.R., Current progress in innovative engineered antibodies. Protein Cell, 2017). При оценке лекарственных форм Fc-слитых белков видно, что четыре из Fc-слитых белков реализуются на рынке только в жидкой форме, а пять реализуются на рынке только в лиофилизированной форме. Остальные два получены в виде состава как в жидкой, так и в лиофилизированной формах. Указанное ясно демонстрирует то, что способ лиофилизации часто применяется для стабилизации Fc-слитых белков. Кроме того, во многих случаях было показано, что лиофилизированный состав и процесс лиофилизации также увеличивают стабильность белков (Siew, A., Freeze Drying Protein Formulations, Pharmaceutical Technology, Volume 38, Issue 5, 2014).

В целом, белки характеризуются очень коротким периодом полувыведения и подвергаются денатурации (такой как агрегация, диссоциация и адсорбция на поверхности сосудов) под воздействием многих различных факторов, таких как неблагоприятные температуры, граница раздела вода-воздух, высокое давление, физическая/механическая нагрузка, органические растворители и загрязнение микроорганизмами.

Следовательно, денатурированный белок теряет присущие ему физико-химические свойства и физиологическую активность. Денатурация белков часто является необратимой, и вследствие этого белки, после того, как денатурируют, могут не восстановить свои природные свойства до исходного состояния и в конечном итоге оседают в виде агрегатов.

Обычный подход к минимизации агрегации представляет собой ограничение подвижности белков с целью уменьшения количества столкновений. Для преодоления нестабильности белков в водных составах терапевтическим белковым продуктам придают большую стабильность посредством лиофилизации (сублимационного высушивания). Лيوфилизированные продукты обычно сопровождаются стерильной водной средой для восстановления.

В EP 0674524 B1 описан стабильный лиофилизированный состав на основе G-CSF и способ его получения. Данный состав включает в себя G-CSF и стабилизирующее количество по меньшей мере одного стабилизирующего средства, выбранного из группы, состоящей из мальтозы, целлобиозы, генциобиозы, изомальтозы и сахарозы, где водный раствор характеризуется pH 7-8. В US 9283260 B2 описана стабильная лиофилизированная терапевтическая композиция на основе пептидного антитела, такая как композиция, содержащая от 1 до 100 мг/мл связывающего пептида Fc-M<sub>10</sub>, содержащая 10 mM гистидина в качестве буфера, 4% вес./об. маннита в качестве объемообразующего средства, 2% вес./об. сахарозы в качестве стабилизирующего средства и 0,004% вес./об. полисорбата-20 в качестве поверхностно-активного вещества. В EP 2945593 A4 описан способ получения лиофилизированной фармацевтической композиции, содержащей белок, а в EP 3125923 A2 описана лиофилизированная фармацевтическая композиция, содержащая ромиплостим, - буфер, который выбран из группы, состоящей из цитратного, фосфатного, аланинового, глицинового, аргининового буфера или их комбинации, полисорбата 20 в качестве поверхностно-активного вещества и объемообразующего средства, выбранного из сахарозы, трегалозы или их комбинации.

Платформа на основе гибридного Fc (hyFc), которая является молекулой, представляющей интерес, тестируемой в отношении лиофилизации и стабилизации в настоящем изобретении, была разработана как для дополнительного увеличения периода полувыведения конъюгированных лекарственных средств из плазмы крови, так и для минимизации цитотоксичности и иммуногенности (EP 20080766022, US 8586038 B2). Для данной цели генетически комбинировали два разных иммуноглобулина, характеризующиеся отсутствием ответов ADCC и CDC. Гибридный Fc получали из комбинаций подклассов IgG человека или из комбинаций IgD и IgG человека. Гибридный Fc, в случае если он присоединен к биологически активной молекуле, является эффективным в отношении увеличения периода полувыведения биологически активной молекулы в сыворотке крови, а также повышения уровня экспрессии полипепти-

да, в случае если экспрессируется нуклеотид, кодирующий полипептид Fc-слитого белка. Таким образом, G-CSF, слитый с гибридным Fc (hyFc), также характеризуется более продолжительным периодом полувыведения в плазме крови, эффективным уровнем экспрессии, элиминированной цитотоксичностью и сниженной иммуногенностью (US 8586048 B2). В данном отношении hy-Fc-слитый G-CSF является уникальной и оригинальной молекулой, где Fc-часть сама по себе представляет собой слияние двух молекул иммуноглобулина, и при этом эта первая слитая молекула является дополнительно слитой с активной молекулой. Поскольку данная структура требует внимания в отношении стабильности как части слитого Fc, так и G-CSF-части, то она отличается от других обычных Fc-слитых лекарственных средств и требует дополнительных отличающихся и уникальных растворов для обеспечения ее стабильности. В данном отношении для целей настоящего изобретения проводили изучение литературы, касающейся стабильности обычных Fc-слитых белков, однако само по себе настоящее изобретение было создано в соответствии с конкретными потребностями в отношении этого уникального hy-Fc-слитого G-CSF (US 8586048 B2).

В более ранней заявке на патент согласно PCT, PCT/TR2018/050208, описан способ получения стабильного жидкого состава на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc. Жидкая форма для введения характеризуется, в частности, содержанием G-CSF, слитого с гибридным Fc, с pH в диапазоне от 3,8 до 6,5, предпочтительно от 4,0 до 4,6.

В настоящем изобретении был разработан и продемонстрирован на примерах стабильный лиофилизированный состав на основе hy-Fc-слитого G-CSF, описанного в US 8586048 B2.

#### **Описание задачи**

Было продемонстрировано, что многие Fc-слитые белки характеризуются нестабильностью в жидких составах. В то время как диапазон агрегации для жидких составов на основе рекомбинантных антител составляет 0,1-1% в год, агрегация Fc-слитых белков в жидких составах составляет 1-10% в год. Как показано Cao et al., в присутствии воды на стабильность Fc-слитых белков оказывалось значительное влияние, и при этом происходила химическая деградация (Cao, W. et al., Formulation, Drug Product, and Delivery: Considerations for Fc-Fusion Proteins. In Therapeutic Fc-Fusion Proteins (eds S. M. Chamow, T. Ryll, H. B. Bowman and D. Farson), 2013).

В исследованиях стабильности, как и другие Fc-слитые белки, hy-Fc-слитый G-CSF также продемонстрировал более низкую стабильность в некоторых условиях по сравнению с рекомбинантными антителами, присутствующими в неслитой форме. В дополнение, структура hy-Fc-слитого G-CSF отличается от структуры других обычных Fc-гибридов. В частности, другие обычные Fc-платформы часто содержат Fc-область IgG2 или аналогичных иммуноглобулинов, и при этом лекарственное средство является непосредственно слитым с этой одной Fc-областью иммуноглобулина. Однако hy-Fc-платформа (EP 20080766022, US 8586038 B2) представляет собой комбинацию подклассов IgD и IgG, где сама по себе Fc-часть иммуноглобулина представляет собой слитую структуру, и слияние лекарственного средства с этой иммуноглобулиновой частью образует вторую слитую структуру. В данном отношении оригинальная уникальная молекула hy-Fc-G-CSF требует внимания в отношении стабильности как слитой структуры Fc-части, так и G-CSF-части, а следовательно, необходимы дополнительные различные и уникальные решения для сохранения ее стабильности. В рамках этого, хотя для жидкого состава на основе hy-Fc-слитого G-CSF могут быть определены подходящие условия (PCT/TR2018/050208), было также решено обратиться ко второй форме состава, а именно, лиофилизированной форме, с целью достижения увеличения срока годности и облегчения хранения и распространения продукта по всему миру.

#### **Описание изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает стабильный лиофилизированный фармацевтический состав, полученный посредством лиофилизации водного препарата, содержащего (i) по меньшей мере 10 мг/мл G-CSF, слитого с гибридным Fc; (ii) по меньшей мере одно стабилизирующее средство в виде комбинации трегалозы и сорбита, где весовое соотношение трегалозы и сорбита составляет от 2:1 до 4:1; (iii) по меньшей мере одно неионогенное поверхностно-активное вещество на основе полоксамера; и (iv) ацетатный буфер; где значение pH водного препарата составляет от 3,8 до 5,2.

В предпочтительном варианте осуществления значение pH водного препарата составляет от 4 до 5.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления концентрация трегалозы в водном препарате составляет от 5,0 до 7,0% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления концентрация сорбита в водном препарате составляет от 1,5 до 2,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления общая концентрация стабилизирующего средства составляет от 6,5 до 9,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества на основе полоксамера составляет от 0,08 до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления концентрация G-CSF, слитого с гибридным Fc, составляет от 10 до 80 мг/мл в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления концентрация G-CSF, слитого с гибридным

ным Fc, составляет от 20 до 40 мг/мл в пересчете на общий объем водного препарата.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления водный препарат содержит:

- (i) G-CSF, слитый с гибридным Fc в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) комбинацию трегалозы и сорбита в качестве стабилизирующего средства, где трегалоза составляет от 5,0 до 7,0% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата, и сорбит составляет от 1,5 до 2,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата;
- (iii) полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества в концентрации от 0,08 до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение лиофилизированной композиции, содержащей молекулы G-CSF пролонгированного действия, слитые посредством пептидной связи с подобной моноклональному антителу платформой в виде гибридного Fc (hu-Fc). Состав по настоящему изобретению, полученный посредством лиофилизации водного препарата на основе рекомбинантного G-CSF-huFc человека, должен характеризоваться особенно подходящим pH, стабилизирующими средствами и поверхностно-активным веществом, которые обеспечивают возможность лиофилизации hu-Fc-слитого G-CSF и высокую стабильность.

"Стабильный" состав или лекарственный продукт является таким, в котором содержащаяся молекула hu-Fc-слитого G-CSF по существу сохраняет свою биофизическую и химическую стабильность и целостность во время процесса лиофилизации и хранения. Стабильность составов на основе молекулы hu-Fc-слитого G-CSF можно измерять после восстановления лиофилизованного состава и воздействия на него различных температур в течение различных периодов времени. Изменение чистоты, биофизических свойств и эффективности молекулы Fc-слитого G-CSF является главным индикатором стабильности и, таким образом, их мониторинг должен осуществляться при выбранных температурах в определенные интервалы времени. В одном варианте осуществления в стабильном лиофилизованном составе на основе hu-Fc-слитого G-CSF может сохраняться более чем приблизительно 95% hu-Fc-слитого G-CSF после хранения при 2-8°C, 25°C-60% RH, 30°C-65% RH и 40°C-75% RH в течение 3 месяцев.

Термин "препарат" относится к полученному водному составу перед лиофилизацией. Затем препарат, который содержит терапевтически эффективное количество G-CSF, слитого с гибридным Fc, по меньшей мере одно стабилизирующее средство, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество и буферную систему, используемую для регулирования pH раствора, подвергали лиофилизации с получением лиофилизированной фармацевтической композиции на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое при введении живому субъекту оказывает требуемый эффект в отношении живого субъекта. Как правило, терапевтически эффективное количество G-CSF (документ Neulasta EMA, Европейского агентства лекарственных средств) составляет 6 мг на одну процедуру применения. Для обеспечения такого же терапевтического эффекта концентрация стабильной формы G-CSF, слитого с гибридным Fc, в настоящем изобретении составляет по меньшей мере 10 мг/мл, в частности от примерно 10 до 80 мг/мл и предпочтительно от примерно 20 до 40 мг/мл.

Термин "буферная система" относится к одному или более компонентам, которые при добавлении к водному раствору способны защищать раствор от варьирования значений pH при добавлении кислоты или щелочи или при разбавлении с помощью растворителя. Таким образом, буферный раствор играет важную роль в стабилизации hu-Fc-G-CSF перед лиофилизацией и после восстановления. Можно использовать буферную систему, выбранную из группы, состоящей из цитратного, цитрат-фосфатного, аланинового, глицинового, аргининового, ацетатного, сукцинатного, гистидинового буфера по отдельности или их комбинации. В настоящем изобретении выбрана буферная система, содержащая ацетат натрия и уксусную кислоту/гидроксид натрия. В частности, можно использовать тригидрат ацетата натрия.

"Стабилизирующее средство" способствует стабильности компонентов полипептида, сохраняя тем самым их терапевтическую эффективность во время процесса лиофилизации и хранения. В настоящем изобретении в состав также можно включать сахара, такие как глюкоза, трегалоза, сахароза или сахарные спирты, такие как маннит, сорбит и ксилит. В пересчете на общий объем восстановленного состава концентрация сахара или сахарного спирта предпочтительно составляет от приблизительно 1,0 до примерно 15,0% (вес./об.). В настоящем изобретении стабилизирующие средства представляют собой комбинацию трегалозы и сорбита, где весовое соотношение трегалозы и сорбита составляет от 2:1 до 4:1, и общая концентрация стабилизирующего средства составляет от 6,5 до 9,5% (вес./об.). Можно использовать гидрат трегалозы. Примером гидрата трегалозы может служить дигидрат трегалозы.

"Поверхностно-активное вещество" представляет собой поверхностно-активную молекулу, содержащую как гидрофобную часть (например, алкильную цепь), так и гидрофильную часть (например, карбоксильную и карбоксилатную группы). Для предупреждения поверхностной денатурации и агрегации во время лиофилизации в составах на основе белка обычно используются неионогенные поверхностно-активные вещества (Cao, W. et al, Formulation, Drug Product, and Delivery: Considerations for Fc-Fusion Proteins. In Therapeutic Fc-Fusion Proteins (eds S. M. Chamow, T. Ryll, H. B. Bowman and D. Farson), 2013). В настоящем изобретении неионогенное поверхностно-активное вещество на основе полоксамера используется в концентрации от 0,08 до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем состава.

Все изобретения, раскрытые в данном документе, являются полностью специфическими в отношении описанного лекарственного средства на основе hu-Fc-G-CSF и разрабатывались с учетом конкретных требований по обеспечению стабильности этой уникальной оригинальной молекулы (US 8586048 B2). Настоящее изобретение отличается от предыдущего уровня техники тем, что представляет собой белок "G-CSF третьего поколения", а именно, G-CSF, слитый с гибридным Fc (hu-Fc-G-CSF).

Структура hu-Fc-G-CSF отличается как от ранее известных молекул G-CSF (филграстим и пэгфилграстим), так и от других Fc-слитых белков и моноклональных антител (mAb или MoAb). Принимая во внимание его отличающуюся структуру, ему требуются отличающиеся от предыдущих растворы для обеспечения его стабильности за счет надлежащего состава. Во-первых, hu-Fc-G-CSF содержит два не-природных участка соединения между IgD, IgG и G-CSF, в отличие от mAb или обычных гибридов Fc. Участки соединения hu-Fc-G-CSF представляют собой новые уязвимые участки, вызывающие нестабильность молекулы. Таким образом, растворы для конкретных составов на основе mAb или обычных Fc не предоставляют приемлемых решений для получения составов на основе hu-Fc-G-CSF.

Во-вторых, поскольку hu-Fc-G-CSF представляет собой гибридный трипептид трех вышеупомянутых различных частей, то все они требуют отдельной поддержки в отношении их собственной стабильности. Следует обращать внимание как на стабильность Fc-части, происходящей из IgG и IgD, так и отдельно на стабильность G-CSF-части. Эти различные части требуют различных условий для поддержания стабильности, что создает более сложную проблему, требующую решения. Одним из примеров может являться возможность использования очень узкого диапазона pH, как указано в поданной заявке.

В-третьих, обычные Fc-слитые структуры и hu-Fc-G-CSF отличаются еще в одном отношении. Обычные Fc-слитые структуры получают за две стадии, и они содержат по меньшей мере одно перекрестносшивающее химическое средство. На первой стадии Fc и активную молекулу получают с помощью генной инженерии, но отдельно, из двух отдельных генетических кодов. Затем на второй стадии две части конъюгируют химическими способами с использованием перекрестносшивающего средства. Напротив, hu-Fc-G-CSF получают непосредственно в ходе всего одной стадии получения с помощью генной инженерии с использованием одного единого теоретически слитого генетического кода. Что гораздо важнее, в его структуре отсутствуют и какие-либо небелковые соединения, и какие-либо химические перекрестносшивающие средства, как у обычных Fc-слитых белков. Эти важные структурные различия между hu-Fc-G-CSF и обычными Fc-слитыми структурами создают потребность в различных стабилизирующих условиях.

В целом, поскольку hu-Fc-G-CSF структурно полностью отличается от других G-CSF, mAb или обычных Fc-гибридов, то требуется совершенно иной подход для разработки состава на его основе, приемлемого для стабильности этой отличающейся структуры.

Отличия от других молекул G-CSF объясняются следующим образом.

G-CSF первого поколения: филграстим (нейпоген®) состоит только из бактериального G-CSF без каких-либо модификаций, что обуславливает его более быстрое выведение из сыворотки крови.

Единственная структура G-CSF нейпогена является значительно меньшей, и ее легче получать в составе по сравнению с hu-Fc-G-CSF.

G-CSF второго поколения: пэгфилграстим (НЕУЛАСТА®) содержит пегилированный G-CSF, а следовательно характеризуется сравнительно более продолжительным периодом полувыведения. Напротив, известно, что PEG может характеризоваться некоторыми побочными эффектами, а пегилирование вводит дополнительную стадию в ходе получения. В структурном отношении присоединение PEG или hu-Fc к G-CSF, в свою очередь, создает очень разные структуры.

G-CSF третьего поколения: G-CSF, слитый с гибридным Fc (Hu-Fc-G-CSF), молекула, используемая в настоящем изобретении, представляет собой G-CSF третьего поколения, поскольку является гибридом 3 отдельных молекулярных соединений, а именно, IgD, IgG и G-CSF, составленных вместе с помощью генной инженерии. Как слияние IgD и IgG, так и связывание G-CSF осуществляются посредством транскрипции и трансляции одного единого генетического кода, состоящего из генетических кодов трех этих структур. Формула генетического кода ранее была защищена патентом US 8586048 B2. Эту структуру с более высокой молекулярной массой труднее стабилизировать по сравнению с филграстимом и пэгфилграстимом. Таким образом, для разработки состава на основе hu-Fc-G-CSF требуются различные условия и комбинации.

Отличия от других Fc-гибридов включают один единый Fc-домен из одной единой молекулы Ig. В таких структурах "гибрид" означает связывание Fc из Ig с активным ингредиентом. Однако Fc-часть структуры Hu-Fc-G-CSF, называемая гибридным Fc, образована двумя разными молекулами Ig, а именно, IgD и IgG. G-CSF связан с этой структурой гибридного Fc. Таким образом, в случае hu-Fc-G-CSF термин "гибрид" означает два разных связывания, где первое представляет собой связывание IgD и IgG с образованием платформы hu-Fc, а второе представляет собой связывание G-CSF с этой платформой hu-Fc.

Во-вторых, в отличие от других обычных Fc-гибридов, которые содержат перекрестносшивающие средства для слияния Fc с активными молекулами, hu-Fc-G-CSF не содержит какого-либо перекрестно-

шивающего средства. Слияние обычных Fc-слитых лекарственных средств осуществляют путем получения Fc и активной молекулы в отдельности и выполнения химического слияния после получения в качестве второй стадии. Однако слияние hu-Fc-G-CSF осуществляют с помощью генной инженерии, путем транскрипции и трансляции единого генетического кода, и при этом в структуре не используется перекрестносливающее средство. Этот генетический код предварительно теоретически получен и защищен упомянутым патентом US 8586048 B2.

Как впервые указано в патенте US 8586048 B2, G-CSF, слитый с гибридным Fc (hu-Fc-G-CSF), представлен следующей формулой (I),

формула (I)

N'-G-Y-Z2-Z3-Z4-C',

где G представляет собой G-CSF;

N' представляет собой N-конец полипептида, и C' представляет собой C-конец полипептида;

Y представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую 5 до 64 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 162 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 99 до 162 в SEQ ID NO: 2;

Z2 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 4 до 37 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 163 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 163 до 199 в SEQ ID NO: 2;

Z3 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 71 до 106 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 220 в направлении N-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 115 до 220 в SEQ ID NO: 3; и

Z4 представляет собой аминокислотную последовательность, содержащую от 80 до 107 последовательных аминокислотных остатков от аминокислотного остатка в положении 221 в направлении C-конца, выбранных из аминокислотных остатков в положениях от 221 до 327 в SEQ ID NO: 3.

В данном отношении huFc-слитый G-CSF является уникальной и оригинальной молекулой, где Fc-часть сама по себе представляет собой слияние двух молекул иммуноглобулина, и при этом эта первая слитая молекула является дополнительно слитой с активной молекулой.

В настоящем изобретении использовали hu-Fc-платформу и G-CSF, имеющих аминокислотную последовательность из гуманизированных организмов. Дополнительная реакция слияния не использовалась, так как слияния между IgD и IgG и между G-CSF и иммуноглобулиновой частью обеспечивались посредством единого генетического кода и единой реакции транскрипции-трансляции. Пептидная связь между G-CSF и hu-Fc-платформой образована между пролином и аргинином. Аминокислотная последовательность мономера hu-Fc-слитого G-CSF представлена ниже. Сигнальная, G-CSF, N-концевая последовательность и последовательность hu-Fc указаны в соответствующем формате. Схематическое изображение белковой структуры hu-Fc-слитого G-CSF представлено на фиг. 1. Гибридный Fc, используемый для связывания с G-CSF, получают из комбинации частей IgD и IgG человека. В этой структуре (фиг. 1) (i) часть IgD человека (шарнир IgD и N-концевой CH2), которая не вызывает ответа ADCC, использовали для устранения цитотоксичности, и (ii) в случае IgG4 использовали часть, которая также устраняет цитотоксичность, поскольку не вызывает ответа CDC. Та же самая часть обладает сильной способностью связываться с FcRn, обеспечивая тем самым длительный период полувыведения за счет циркулирования молекулы посредством связывания с FcRn, и характеризуется 21-дневным периодом циркулирования в сыворотке крови человека.

MAGPATQSPMKLMAIQLLWHSALWTVQEA7FLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQQ  
DGAALQEKLCATYKLCHPPEELVLLGHSLGIPWAPLS SCP SQALQLAGCLSQLHSGL  
FLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQOMEELGMAPALQPTQGAMP  
AFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRYLRHLAQPRNTGRGGEEKKKEKEKEEQ  
EERETKTPPECPSHTQPLGVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVYVDVYQEDPEVQFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK  
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  
YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYVMHEALHNHYTQKLSLSLG

**K**

В целом гибридный Fc, в случае если он присоединен к биологически активной молекуле, является эффективным в отношении увеличения периода полувыведения биологически активной молекулы из сыворотки крови, а также повышения уровня экспрессии полипептида, в случае если экспрессируется нуклеотид, кодирующий полипептид Fc-слитого белка. Таким образом, G-CSF, слитый с гибридным Fc (huFc), также характеризуется более продолжительным периодом полувыведения в плазме крови, эффективным уровнем экспрессии, элиминированной цитотоксичностью и сниженной иммуногенностью (US 8586048 B2).

В настоящем изобретении было обнаружено преимущественное влияние на стабильность молекулы гидролиза при более низких значениях pH ( $\text{pH} < 5,0$ ) в участке соединения с G-CSF и перетасовки дисульфидных связей при высоких значениях pH ( $\text{pH} > 6,5$ ), а также наличие у молекулы склонности к ним. G-CSF содержит две дисульфидные связи, образованные гомологичными цистеиновыми остатками, и дополнительный цистеиновый остаток в положении 17, который не может участвовать в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей. Дисульфидные связи в этих молекулах стабилизируют структуры и делают их устойчивыми к относительно агрессивному воздействию (некоторые протеазы, высокие температуры, денатурирующие растворители, экстремальный pH), которые приводят к денатурации после уменьшения количества дисульфидных связей (Nicos A. Nicola, The waiter and Eliza Hall Institute of Medical Research, "Granulocyte Colony Stimulating Factor", p. 77-100).

Дополнительно, собственные исследования показали, что hu-Fc-слитый G-CSF является нерастворимым или труднорастворимым при pH от 5,3 до 6,0, и известно, что G-CSF сам по себе является стабильным и активным при pH около 4,0 (T. Arakawa, S.J. Prestrelski, L.O. Narhi, T.C. Boone, W.C. Kenney, Cysteine 17 of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor is partially solvent-exposed, J. Protein Chem. 12 (1993) 525-531).

Способы выбора оптимальных составов на основе Fc-слитого G-CSF по настоящему изобретению.

Значение pH водного препарата перед лиофилизацией и водной фармацевтической композиции, полученной путем восстановления лиофилизованного сухого порошка, можно определить с помощью потенциометрического анализа, описанного в статье <791> USP (фармакопеи США).

Анализ посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) может быть проведен для hu-Fc-слитого G-CSF для сравнения его молекулярной массы с молекулярной массой собственного стандартного образца. Лекарственный продукт и собственный стандартный образец разбавляют до 500 мкг/мл с использованием деионизированной воды и доводят до 3 мкг/20 мкл с использованием буфера для образца NuPAGE® LDS (4X) и деионизированной воды. Его загружают в 12% Bis-Tris-гель NuPAGE® Novex 4 (1,0 мм, 10 лунок) для проведения электрофореза. Гель-электрофорез с использованием изоэлектрического фокусирования может использоваться для идентификации диапазона изоэлектрических точек hu-Fc-слитого G-CSF по отношению к собственному стандартному образцу. Лекарственный продукт и собственный стандартный образец разбавляют до 1 мг/мл с использованием деионизированной воды и доводят до 10 мкг/20 мкл с использованием буфера для образца Novex® IEF (2X). Изоэлектрическое фокусирование осуществляют с использованием геля для IEF Novex® с pH 3-10 (1,0 мм, 10 лунок).

Выделение hu-Fc-слитого G-CSF и мониторинг его чистоты с точки зрения свойств мономерности и гидрофобности можно осуществлять с помощью методик жидкостной хроматографии.

Таким образом, эксклюзионная хроматография по размеру (SE-HPLC) может являться предпочтительным способом разделения молекул на основании их размера на высокомолекулярные соединения (HMW) и подвергнувшиеся разрушению соединения с использованием Acquity Arc (Waters). Разделение осуществляется посредством дифференциальной молекулярной эксклюзии или инклюзии в то время, как молекулы мигрируют вдоль длины колонки. Лекарственное вещество разбавляют до 1 мг/мл и подвергают разделению с использованием колонки TSK-GEL G3000SWxL (7,8×300 мм) и предохранительной колонки TSK-GEL G3000SWxL (6×40 мм) (TOSOH Bioscience). Подвижная фаза состоит из 50 мМ фосфатного буфера: 5,34 г двухосновного фосфата натрия, 3,12 г одноосновного фосфата натрия, 8,76 г хлорида натрия в 1 л деионизированной воды, которые смешивают с ацетонитрилом в соотношении 9:1 (об./об.), в то время как конечный pH составляет 7,0. Скорость потока поддерживают при 0,5 мл/мин. и длину волны детектора 214 нм в течение 30 мин. Рассчитывают % долю площади основного пика по отношению к общей площади в соответствии с результатом анализа, где выход указывает на мономерную чистоту.

Обращенно-фазовая высокоэффективная хроматография (RP-HPLC) может являться еще одним способом проверки чистоты посредством разделения их по гидрофобности. Для контроля примесей и времени удерживания вариантов Fc-слитого G-CSF и усеченных форм с использованием Acquity Arc (Waters) используют RP-HPLC. Лекарственное средство в концентрации, составляющей 1 мг/мл, в соответствующем буфере для состава подвергают разделению с использованием колонки Vydac 214TP C4 (4,6×250 мм) (Grace, Vydac) и предохранительной колонки 214MS C4, 5 мкм, 7,5×4,6 мм (Grace, Vydac). Подвижная фаза состоит из 0,15% трифторуксусной кислоты (TFA) в деионизированной воде и 0,15% TFA в ацетонитриле при скорости потока, составляющей 0,5 мл/мин. Длину волны выявления, составляющую 220 нм, поддерживают в течение 35 мин и осуществляют мониторинг % доли площади основного пика по отношению к общей площади в соответствии с результатом анализа.

Остаточную влажность лиофилизованных продуктов определяют способом Карла-Фишера, описанным в статье <921> USP.

Видимые частицы лиофилизованных продуктов определяются невооруженным глазом. Как указано в USP, водные лекарственные формы для инъекций должны являться "по существу свободными" от частиц, различимых невооруженным глазом.

В следующих примерах описано настоящее изобретение, включающее лиофилизированный состав на основе полноразмерного huFc-Fused G-CSF, описанного в US 8586048 B2.

#### Предварительные исследования

Определение соответствующего стабилизирующего средства и буферной системы

В составах на основе Fc-слитых белков, составах с низким pH может встречаться протеолиз и дезамидирование, тогда как составы с высоким pH часто подвергаются агрегации, окислению и перегруппировке дисульфидных связей. (Cao, W., Piedmonte, D. M., Ricci, M. S., & Yeh, P. Y. (2013). Formulation, Drug Product, and Delivery: Considerations for Fc-Fusion Proteins. Therapeutic Fc-Fusion Proteins, 115-154.) В соответствии с данной информацией предварительные исследования начинали при низком pH, составляющем около 4,0.

В предварительных исследованиях вначале получали семь различных водных препаратов, содержащих hu-Fc-слитый G-CSF в качестве активного ингредиента, полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества в ацетатном буфере, имеющем pH приблизительно 4,0, с использованием различных стабилизирующих средств. Эти полученные водные препараты подвергали лиофилизации. После осуществления лиофилизации композиции анализировали в отношении внешнего вида лиофилизата, времени восстановления и pH (pH измеряли в восстановленных водных композициях). Внешний вид лиофилизата является важной характеристикой продуктов сублимационной сушки, которая может изменять качество продукта (прежде всего остаточную влажность, время восстановления, стабильность и активность), что впоследствии может повлиять на безопасность пациента и эффективность продукта. Время восстановления представляет собой промежуток времени, требуемый для регидратации лиофилизованного состава с помощью раствора до осветленного раствора, не содержащего частиц. В настоящем изобретении лиофилизированные составы восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Таблица 1

Предварительные исследования для определения соответствующего стабилизирующего средства

Состав	Компонент	Стабилизирующее средство	После процесса лиофилизации		
			Внешний вид лиофилизата	Время восстановления	pH
Состав-1	0,4% huFc-слитого	4% сорбита	Неудовлетворительно	Неудовлетворительно	-
Состав-2	G-CSF	4% сорбита + 2% сахарозы	Неудовлетворительно	Неудовлетворительно	-
Состав-3	0,1% полоксамера 188	4% сорбита + 2% сахарозы + 4% маннита	Неудовлетворительно	Неудовлетворительно	-
Состав-4	Тригидрат ацетата натрия	4% сорбита + 4% маннита	Неудовлетворительно	Приемлемо	4,12
Состав-5		4% маннита	Приемлемо	Приемлемо (происходит агрегирование*)	5,48
Состав-6		Уксусная кислота/гидроксид натрия	4% маннита + 1% сахарозы	Приемлемо	Приемлемо
Состав-7	Вода	4% маннита + 2% сахарозы	Приемлемо	Приемлемо	4,72

\* Заметно невооруженным глазом.

В соответствии с результатами оценки внешнего вида лиофилизата и времени восстановления составы 1-4 являются неприемлемыми для продукта лиофилизации. Также состав-5 продемонстрировал значительное увеличение агрегации, заметное невооруженным глазом после восстановления с использованием 1 мл воды для инъекций. Эти результаты можно объяснить сдвигом pH выше 5,2 в составе во время лиофилизации (обнаружено, что pH, при которой huFc-слитый G-CSF является нерастворимым или труднорастворимым, соответствует pH 5,3-6,0) вследствие испарения уксусной кислоты. Также повышенный pH наблюдали в составах 6 и 7. Сдвиги pH были ограниченными в составе, содержащем сахарозу, в отличие от состава, содержащего только маннит. В соответствии с этими предварительными результатами было продемонстрировано следующее: приемлемые лиофилизаты не были получены при использовании продуктов, содержащих 4% сорбита, уксусная кислота может вызывать сдвиг pH во время лиофилизации, что может иметь исключительно важное значение для стабильности состава, присутствие сахарозы в составе может улучшать стабильность.

После этих исследований различные буферные системы использовали в тех же составах, которые

приведены ниже. Цитратную буферную систему использовали для предупреждения сдвига pH лиофилизированного продукта. Состав-8 получали с использованием цитратной буферной системы при pH 4,2, содержащей 2,0% hu-Fc-слитого G-CSF в качестве активного ингредиента, полоксамера 188 в качестве поверхностно-активного вещества, 4% маннита и 1% сахарозы в качестве стабилизирующего средства. Состав-9 получали с использованием ацетатной буферной системы при pH 4,2, содержащей 2,0% hu-Fc-слитого G-CSF в качестве активного ингредиента, полоксамера 188 в качестве поверхностно-активного вещества, 4% маннита и 1% сахарозы в качестве стабилизирующего средства. Эти водные препараты выдерживали в течение 1 недели при 25°C перед лиофилизацией с целью демонстрации стабильности hu-Fc-слитого G-CSF при использовании различных буферных систем.

Таблица 2  
Предварительные исследования для определения соответствующей буферной системы

Состав	Стабилизирующее средство	Буферная система	Концентрация hu-Fc-слитого G-CSF (%)	
			До	Через 1 неделю при 25°C
Состав-8	4% маннита + 1% сахарозы	100 мМ цитратного буфера, pH 4,2.	99,8	53,2
Состав-9	4% маннита + 1% сахарозы	10 мМ ацетатного буфера, pH 4,2	99,6	80,6

В составе-8 видимая агрегация происходила в водных препаратах через 1 неделю. В табл. 2 агрегация также показана снижением концентрации почти на 50% в составе-8 и снижением концентрации почти на 20% в составе-9. Эти водные препараты не подвергали лиофилизации в связи с нестабильностью водных форм. Следовательно, пришли к заключению, что hu-Fc-слитый G-CSF является более стабильным в ацетатном буфере, и исследования в отношении разработки состава продолжали с ацетатным буфером.

Трегалозу и сахарозу считали приоритетными при тестирования различных стабилизирующих средств. Хотя была продемонстрирована эффективность сахарозы в повышении стабильности, гидролиз сахарозы в кислой среде мог представлять проблему. Поскольку сахароза в кислой среде подвергается гидролизу, приняли решение в следующих исследованиях использовать трегалозу.

Перед началом исследования составов подготовили предварительное исследование водных препаратов, содержащих полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества в ацетатном буфере при pH 4,25, без hu-Fc-слитого G-CSF с различными комбинациями трегалозы и сорбита для оценки структуры лиофилизатов и сдвигов pH.

Таблица 3  
Определение соответствующего процентного содержания стабилизирующего средства без hu-Fc-слитого белка G-CSF

Составы*	Стабилизирующее средство (вес/об.)	Перед лиофилизацией	После лиофилизации	
		pH**	Внешний вид лиофилизата	pH**
Состав-10	1,5% сорбита : 7,0% трегалозы*	4,25	Приемлемо	4,55
Состав-11	2,0% сорбита : 5,5% трегалозы*	4,26	Приемлемо	4,35
Состав-12	2,5% сорбита : 5,5% трегалозы*	4,26	Приемлемо	4,48
Состав-13	3,0% сорбита : 3,0% трегалозы*	4,25	Неудовлетворительно	4,68
Состав-14	4,0% сорбита : 1,0% трегалозы*	4,25	Неудовлетворительно	4,98
Состав-15	5,0% сорбита	4,28	Неудовлетворительно	5,16

\* В качестве трегалозы использовали дегидрат трегалозы.

\*\* Составы получали с использованием 1 мл воды для инъекций, а лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Согласно результатам, приведенным в табл. 3, приемлемые лиофилизаты получали при пониженном содержании сорбита и повышенном содержании трегалозы. Дополнительно, снижение процентного содержания трегалозы в составах вызывало сдвиг pH в сторону повышения. В заключение, содержание сорбита, составляющее 2%, выбирали в качестве предела содержания сорбита в составе с получением

приемлемой структуры лиофилизата.

В предварительных исследованиях испытывали различные стабилизирующие средства и буферные системы, чтобы найти подходящие вспомогательные вещества. Стабильный состав для лиофилизации, содержащий уникальную оригинальную молекулу hu-Fc-G-CSF, является полностью специфическим и достаточно сложным. Данное исследование является первым исследованием лиофилизации, включающим hu-Fc-G-CSF и обеспечивающим стабильность данного уникального лекарственного продукта, совместно содержащего Fc-слитую часть и G-CSF-часть. Таким образом, в следующих примерах водные препараты получают с содержанием hu-Fc-слитого G-CSF в качестве активного ингредиента, полоксамера 188 в качестве поверхностно-активного вещества, комбинации трегалозы и сорбита в качестве стабилизирующего средства в ацетатном буфере.

Пример 1. Определение композиции для составов на основе hu-Fc-слитого G-CSF.

Собственные исследования показали, что изоэлектрическая точка (pI) huFc-слитого G-CSF находится между 5,3 и 6,9. В данном диапазоне huFc-слитый G-CSF обладает ограниченной растворимостью. Более того, согласно наблюдениям устойчивости коллоидной системы huFc-слитого G-CSF увеличивалась при снижении pH (от 5,2 до 3,8) (заявка на патент согласно PCT PCT/TR2018/050208). Следовательно, в соответствии с собственными исследованиями определяли оптимальный диапазон pH для этой композиции, составляющий от 3,8 до 5,2, предпочтительно от 4 до 5.

После определения диапазона pH комбинацию сорбита и трегалозы выбирали в качестве стабилизирующего средства; полоксамер 188 выбирали в качестве поверхностно-активного вещества. На основании данного выбора определяли состав для лиофилизации, показанный ниже (табл. 4).

Таблица 4

Определенная композиция состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF		
Компонент	Функция	Количество в процентах** % (вес/об.)
hu-Fc-слитый G-CSF	Активный ингредиент	2,0
Сорбит	Стабилизирующее средство	1,5-2,5
Дигидрат трегалозы	Стабилизирующее средство/объемобразующее средство	5,0-7,0
Полоксамер 188 (Pluronic F68)	Поверхностно-активное вещество	0,08-0,15
Тригидрат ацетата натрия	Буферное средство	0,016
Уксусная кислота/гидроксид натрия	Буферное средство	q.s.
Вода	Растворитель	*

\* Составы получали с использованием 1 мл воды для инъекций, а лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

q.s.: требуемое количество.

Пример 2. Кратковременная стабильность и оценка эффектов в отношении замораживания-оттаивания определенного состава в жидкой форме.

Чтобы определить пригодность определенного состава для сублимационного высушивания оценивали кратковременную стабильность состава в жидкой форме, приведенного в табл. 5, и эффект в отношении замораживания-оттаивания.

Таблица 5

Композиция состава на основе hu Fc-слитого G-CSF		
Компонент	Функция	Количество
hu-Fc-слитый G-CSF	Активный ингредиент	20 мг
Сорбит	Стабилизирующее средство	20 мг
Дигидрат трегалозы	Стабилизирующее средство/объемобразующее средство	55,26
Полоксамер 188 (Pluronic F68)	Поверхностно-активное вещество	1 мг
Тригидрат ацетата натрия	Буферное средство	0,16 мг
Уксусная кислота/гидроксид натрия	Буферное средство	q.s.
Вода	Растворитель	1 мл

q.s.: требуемое количество.

Состав на основе G-CSF получали в виде композиции состава, приведенной выше (табл. 5), с по-

мощью растворения вспомогательных веществ в воде для инъекций. Концентрация белка составляла 20 мг/мл, и pH состава составлял pH 4,6.

Для определения кратковременной стабильности в жидкой форме состав инкубировали при 25°C в течение 1 недели. Через 1 неделю стабильность huFc-слитого G-CSF

оценивали с помощью анализов SE-HPLC, RP-HPLC, SDS-PAGE и IEF. С другой стороны, эффекты замораживания-оттаивания оценивали с помощью анализов SE-HPLC после 3 циклов замораживания-оттаивания (-80 и 25°C).

Таблица 6  
Кратковременная стабильность жидкой формы состава на основе huFc-слитого G-CSF и оценка эффекта замораживания-оттаивания в отношении этого состава

ТЕСТЫ	КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ	t=0	Через 1 неделю при 25°C	После цикла замораживания-оттаивания 1	После цикла замораживания-оттаивания 2	После цикла замораживания-оттаивания 3
pH	Н. д.	4,6	4,5	-	-	-
SDS-PAGE (идентичность)	Основная полоса соответствует вала стандартному образцу	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	-	-
IEF (идентичность)	Основная полоса соответствует вала стандартному образцу (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	-	-
SE-HPLC (чистота)	≥ 93%	99,5	99,5	99,5	99,5	99,4
RP-HPLC (чистота)	≥ 90%	96,3	95,0	95,1	-	-

В соответствии с результатами, приведенными в таблице 6, через неделю при 25°C результаты SE-HPLC, RP-HPLC, SDS-PAGE и IEF, как было обнаружено, являлись аналогичными. Также определили, что чистота согласно SE-HPLC являлась аналогичной после 3 циклов замораживания-оттаивания. Эти результаты продемонстрировали, что этот состав может оставаться стабильным во время осуществления лиофилизации при предполагаемом диапазоне pH.

Пример 3. Лиофилизация состава на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, при pH 4,8 (LF4,8).

Для лиофилизации состава на основе huFc-слитого G-CSF (табл. 5) состав получали при pH 4,8 и кодировали как LF4,8. Затем продуктом наполняли стеклянные флаконы 2R типа 1 и частично закрывали пробками для лиофилизации. Циклы лиофилизации осуществляли в сублимационной сушильной установке Lyobeta (Telstar, Испания). Цикл лиофилизации осуществляли посредством начальной стадии выдерживания при 5°C, стадии замораживания при -50°C, стадии первичного высушивания при -40°C, 0,07 мбар в течение 48 ч и стадии вторичного высушивания при 35°C в течение 7 ч.

Перед лиофилизацией и после нее стабильность huFc-слитого G-CSF оценивали с помощью SDS-PAGE, IEF, SE-HPLC, RP-HPLC и анализов видимых частиц. После лиофилизации остаточную влажность определяли с помощью анализа Карла-Фишера. Значение pH состава измеряли до осуществления лиофилизации и после восстановления лиофилизованного состава. Результаты показаны в табл. 7 ниже.

Таблица 7  
 Результаты анализа состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF при pH 4,8 (LF4,8)  
 перед лиофилизацией и после лиофилизации

Тесты	Критерии приемлемости	LF4,8	
		Перед лиофилизацией	После лиофилизации
<b>pH*</b>	Н. д.	4,8	4,9
<b>SDS-PAGE (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствовала стандартному образцу</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)
<b>IEF (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствовала стандартному образцу (pI 5,3 ~ 6,9)</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)
<b>SE-HPLC (чистота)</b>	≥ 93%	99,4	99,4
<b>RP-HPLC (чистота)</b>	≥ 90%	96,4	96,4
<b>Остаточная влажность</b>	< 3%	Н. д.	1,3
<b>Видимые частицы</b>	<i>По существу не содержит</i>	удовлетворительно	удовлетворительно

\*Лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

После осуществления лиофилизации получали фармацевтически приемлемые лиофилизаты (белые и неповрежденные) (Patel, S.M., et al. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable?, Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 106, Issue 7, Pages 1706-1721, 2017). Чистота согласно SE-HPLC и чистота согласно RP-HPLC, как обнаружилось, были аналогичными перед лиофилизацией и после лиофилизации. После лиофилизации наблюдался небольшой сдвиг pH - от pH 4,8 до pH 4,9.

Также обнаружили, что результаты SDS-PAGE и IEF являлись аналогичными. Следовательно, структура hu-Fc-слитого G-CSF сохранялась в определенном составе с pH 4,8 во время осуществления лиофилизации.

Пример 4. Исследования стабильности с ускоренной деградацией лиофилизированного состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF (LF4,8).

Лиофилизированный состав на основе hu-Fc-слитого G-CSF (LF4,8), приведенный в примере 3, подвергали исследованиям стабильности с ускоренной деградацией при 25°C с 60% относительной влажностью (RH) и при 40°C с 75% RH в течение 1 недели и 2 недель для предвидения потенциальной стабильности белка в течение срока его хранения. Результаты показаны в табл. 8 и 9 ниже.

Таблица 8

Результаты анализа лиофилизированного состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF через 1 неделю воздействия условий исследования стабильности с ускоренной деградацией

Через 1 неделю	Критерии приемлемости	2-8°C (в качестве контроля)	25°C - 60% RH	40°C - 75% RH
<b>pH*</b>	Н. д.	5,1	5,0	4,9
<b>SDS-PAGE (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствовала стандартному образцу</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)
<b>IEF (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствовала</i>	Аналогично стандарту, основная полоса	Аналогично стандарту, основная полоса	Аналогично стандарту, основная полоса

	<i>вала стандартному образцу (pl 5,3 ~ 6,9)</i>	(pl 5,3 ~ 6,9)	(pl 5,3 ~ 6,9)	(pl 5,3 ~ 6,9). Слабо, основные варианты выражены больше, чем стандарт.
<b>SE-HPLC (чистота)</b>	≥ 93%	98,6	98,6	98,5
<b>RP-HPLC (чистота)</b>	≥ 90%	97,3	98,5	96,4
<b>Остаточная влажность</b>	< 3%	1	0,8	1
<b>Видимые частицы</b>	<i>По существу не содержит</i>	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно

\* Лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Таблица 9

Результаты анализа лиофилизированного состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF через 2 недели воздействия условий исследования стабильности с ускоренной деградацией

Через 2 недели	Критерии приемлемости	2-8°C (в качестве контроля)	25°C - 60% RH	40°C - 75% RH
<b>pH*</b>	Н. д.	5,0	5,0	5,0
<b>SDS-PAGE (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствует вала стандартному образцу</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)
<b>IEF (идентичность)</b>	<i>Основная полоса соответствует вала стандартному образцу (pl 5,3 ~ 6,9)</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (pl 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pl 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pl 5,3 ~ 6,9). Слабо, основные варианты выражены больше, чем стандарт
<b>SE-HPLC (чистота)</b>	≥ 93%	98,3	98,4	98,2
<b>RP-HPLC (чистота)</b>	≥ 90%	95,8	95,5	95,3
<b>Остаточная влажность</b>	< 3%	1,7	1,3	1,8
<b>Видимые частицы</b>	<i>По существу не содержит</i>	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно

\* Лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Было продемонстрировано, что лиофилизированный состав на основе hu-Fc-слитого G-CSF (LF4,8), как обнаружено, являлся стабильным при исследованиях стабильности с ускоренной деградацией при 25°C с 60% относительной влажностью (RH) и при 40°C с 75% RH в течение 1 недели и 2 недель.

Пример 5. Лиофилизация составов на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, при pH 4,2 (LF4,2) и pH 4,5 (LF4,5).

Для лиофилизации получали составы на основе huFc-слитого G-CSF с pH 4,2 (LF4,2) и pH 4,5 (LF4,5), приведенные в табл. 10. Затем продуктами наполняли стеклянные флаконы 2R типа 1 и частично закрывали пробками для лиофилизации. Циклы лиофилизации осуществляли в сублимационной сушильной установке Lyobeta (Telstar, Испания). Цикл лиофилизации осуществляли посредством начальной стадии выдерживания при 5°C, стадии замораживания при -50°C, стадии первичного высушивания при -40°C, 0,07 мбар в течение 48 ч и стадии вторичного высушивания при 35°C в течение 7 ч.

Таблица 10

Композиции составов на основе hu-Fc-слитого G-CSF при pH 4,2 (LF4,2) и pH4,5(LF4,5)

Компонент	Функция	Количество
hu-Fc-слитый G-CSF	Активный ингредиент	20 мг
Сорбит	Стабилизирующее средство	20 мг
Дигидрат трегалозы	Стабилизирующее средство/объемобразующее средство	60,26 мг
Полоксамер 188 (Pluronic F68)	Поверхностно-активное вещество	1 мг
Тригидрат ацетата натрия	Буферное средство	0,16 мг
Уксусная кислота/гидроксид натрия	Буферное средство	q.s.
Вода	Растворитель	1 мл

Перед лиофилизацией и после нее стабильность huFc-слитого G-CSF оценивали с помощью SDS-PAGE, IEF, SE-HPLC, RP-HPLC и анализов видимых частиц. После лиофилизации остаточную влажность определяли с помощью анализа Карла-Фишера. Также pH составов измеряли до осуществления лиофилизации и после восстановления лиофилизированных составов. Результаты показаны в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Результаты анализа состава на основе hu-Fc-слитого G-CSF при pH 4,2 (LF4,2) и pH 4,5 (LF4,5) перед лиофилизацией и после лиофилизации

Тесты	Критерии приемлемости	LF4,2		LF4,5	
		Перед лиофилизацией	После лиофилизации	Перед лиофилизацией	После лиофилизации
pH*	Н. д.	4,2	4,4	4,5	4,7
SDS-PAGE (идентичность)	<i>Основная полоса соответствует стандартному образцу</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (~98 кДа)			
IEF (идентичность)	<i>Основная полоса соответствует стандартному образцу (pI 5,3 ~ 6,9)</i>	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)	Аналогично стандарту, основная полоса (pI 5,3 ~ 6,9)
SE-HPLC (чистота)	≥ 93%	98,2	98,2	98,2	98,4
RP-HPLC (чистота)	≥ 90%	96,3	96,4	96,3	96,4
Остаточная влажность	< 3%	Н. д.	1,3	Н. д.	1,4
Видимые частицы	<i>По существу не содержит</i>	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно

\* Лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

После осуществления лиофилизации получали фармацевтически приемлемые лиофилизаты для всех составов (белые и неповрежденные) (Patel, S.M., et al. Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable?, Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 106, Issue 7, Pages 1706-1721, 2017). Чистота согласно SE-HPLC и чистота согласно RP-HPLC, как обнаружилось, были аналогичными перед лиофилизацией и после лиофилизации. После лиофилизации в обоих составах наблюдался небольшой сдвиг pH. Также обнаружили, что результаты SDS-PAGE и IEF являлись аналогичными. Следовательно, структура hu-Fc-слитого G-CSF сохранялась в определенном составе при pH 4,2 и pH 4,5 во время осуществления лиофилизации.

Пример 6. Исследования стабильности с ускоренной деградацией лиофилизированных составов на основе hu-Fc-слитого G-CSF и сравнение с жидким составом.

Ллиофилизированные составы на основе (LF4,2, LF4,5, LF4,8) hu-Fc-слитого G-CSF, приведенные в примерах 3 и 5, подвергали исследованиям стабильности с ускоренной деградацией при 40°C с 75% RH в течение 2 недель для предвидения потенциальной стабильности белка в течение срока его хранения. Результаты показаны в табл. 12 ниже.

Таблица 12  
Результаты анализа лиофилизированных составов на основе hu-Fc-слитого G-CSF через 2 недели воздействия условий исследования стабильности с ускоренной деградацией (40°C - 75% RH)

Через 2 недели при 40°C - 75% RH	Критерии приемлемости	Жидкий состав*	LF4,2	LF4,5	LF4,8
pH**	Н. д.	4,4	4,5	4,7	5,0
SE-HPLC (чистота)	≥ 93%	85	98,2	99,4	98,2
RP-HPLC (чистота)	≥ 90%	86,1	96,3	96,3	95,3
Остаточная влажность	< 3%	Н. д.	0,9	1	1,8
Видимые частицы	По существу не содержит	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно

\*Жидкий состав состоял из 20 мг/мл hu-Fc-слитого G-CSF, 10 mM Na/ацетатного буфера, 5% сорбита, 0,1% полоксамера 188. Обнаружили, что этот жидкий состав являлся стабильным в течение 6 месяцев при 2-8°C (заявка на патент согласно PCT PCT/TR2018/050208).

\*\*Ллиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Было продемонстрировано, что лиофилизированные составы (LF4,2, LF4,5, LF4,8) на основе G-CSF, слитого с гибридным Fc, как обнаружено, являлись стабильными по сравнению с жидким составом, который, как обнаружено, являлся стабильным в течение 6 месяцев при 2-8°C (заявка на патент согласно PCT PCT/TR2018/050208). Следовательно, эти результаты показали, что для G-CSF, слитого с гибридным Fc, успешно разработаны стабильные лиофилизированные составы. В настоящем изобретении согласно данному документу лиофилизированная композиция на основе Fc-слитого G-CSF состоит из буферной системы, по меньшей мере одного стабилизирующего средства и по меньшей мере одного поверхностно-активного вещества; где препарат имеет значение pH, составляющее от 3,8 до 5,2, предпочтительно от 4 до 5, и стабилизирующее средство представляет собой комбинацию трегалозы и сорбита.

Дополнительно, лиофилизированный состав LF4,2 на основе hu-Fc-слитого G-CSF подвергали воздействию различных условий исследования стабильности (2-8°C, 25°C - 60% RH, 30°C - 65% RH и 40°C - 75% RH) в течение 3 месяцев, чтобы предвидеть потенциальную стабильность белка в течение срока его хранения. Результаты показаны в табл. 13 ниже.

Таблица 13  
Результаты анализа лиофилизированных составов на основе hu-Fc-слитого G-CSF через 3 месяца при различных условиях исследования стабильности (2-8°C, 25°C - 60% RH, 30°C - 65% RH и 40°C - 75% RH)

Через 3 месяца	Критерии приемлемости	LF 4,2			
		2-8°C	25°C - 60% RH	30°C - 65% RH	40°C - 75% RH
pH**	Н. д.	4,4	4,4	4,4	4,5
SE-HPLC (чистота)	≥ 93%	99,2	99,2	99,1	98,1
RP-HPLC (чистота)	≥ 90%	96,4	96,3	95,1	95,6
Остаточная влажность	< 3%	0,9	1,1	1,2	1,4
Видимые частицы	По существу не содержит	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно	Удовлетворительно

\*\*Лиофилизированный состав восстанавливали с использованием 1 мл воды для инъекций.

Результаты, приведенные в табл. 13, показали, что лиофилизированная композиция, полученная в настоящем изобретении, демонстрировала хорошую стабильность через 3 месяца при различных условиях исследования стабильности. Состав, разработанный в соответствии с настоящим изобретением, демонстрирует неожиданные технические эффекты в условиях исследования стабильности.

Настоящее изобретение может включать сорбит в качестве стабилизирующего средства, предпочтительно в концентрации, составляющей от 1,5% (вес./об.) до 2,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем состава перед лиофилизацией и после восстановления. Настоящее изобретение может включать трегалозу в качестве стабилизирующего средства, предпочтительно в концентрации, составляющей от 5,0% (вес./об.) до 7,0% (вес./об.) в пересчете на общий объем состава перед лиофилизацией и после восстановления. В одном варианте осуществления стабилизирующие средства представляют собой комбинацию трегалозы и сорбита, где весовое соотношение трегалозы и сорбита составляет от 2:1 до 4:1, и общая концентрация стабилизирующего средства составляет от 6,5% (вес./об.) до 9,5% (вес./об.). Настоящее изобретение может включать полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества, предпочтительно в концентрации, составляющей от 0,08% (вес./об.) до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем состава перед лиофилизацией и после восстановления.

#### Пояснение графических материалов

На чертеже представлено схематическое изображение белковой структуры hu-Fc-слитого G-CSF.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильный фармацевтический лиофилизированный состав, полученный посредством лиофилизации водного препарата, содержащего:

- (i) по меньшей мере 10 мг/мл G-CSF, слитого с гибридным Fc;
  - (ii) по меньшей мере одно стабилизирующее средство в виде комбинации трегалозы и сорбита, где весовое соотношение трегалозы и сорбита составляет от 2:1 до 4:1;
  - (iii) по меньшей мере одно неионогенное поверхностно-активное вещество на основе полоксамера; и (iv) ацетатный буфер;
- где значение pH водного препарата составляет от 3,8 до 5,2.

2. Лиофилизированный состав по п.1, где значение pH водного препарата составляет от 4 до 5.

3. Лиофилизированный состав по п.1, где концентрация трегалозы в водном препарате составляет от 5,0 до 7,0% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

4. Лиофилизированный состав по п.1, где концентрация сорбита в водном препарате составляет от 1,5 до 2,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

5. Лиофилизированный состав по п.1, где общая концентрация стабилизирующего средства составляет от 6,5 до 9,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

6. Лиофилизированный состав по п.1, где концентрация неионогенного поверхностно-активного вещества на основе полоксамера составляет от 0,08 до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

7. Лиофилизированный состав по п.1, где концентрация G-CSF, слитого с гибридным Fc, составляет от 10 до 80 мг/мл в пересчете на общий объем водного препарата.

8. Лиофилизированный состав по п.7, где концентрация G-CSF, слитого с гибридным Fc, составляет от 20 до 40 мг/мл в пересчете на общий объем водного препарата.

9. Лиофилизированный состав по п.1, где водный препарат содержит:

- (i) G-CSF, слитый с гибридным Fc в концентрации 20 мг/мл;
- (ii) комбинацию трегалозы и сорбита в качестве стабилизирующего средства, где трегалоза составляет от 5,0 до 7,0% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата, и сорбит составляет от 1,5 до 2,5% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата;
- (iii) полоксамер 188 в качестве поверхностно-активного вещества в концентрации от 0,08 до 0,15% (вес./об.) в пересчете на общий объем водного препарата.

