

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046145**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.09

(21) Номер заявки
202291583

(22) Дата подачи заявки
2020.11.27

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОНЬЮГАТ, СОДЕРЖАЩИЙ ТОКСИН И БИЦИКЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИД, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/940,966**

(32) **2019.11.27**

(33) **US**

(43) **2022.09.26**

(86) **PCT/GB2020/053026**

(87) **WO 2021/105694 2021.06.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙСИКЛТЭКС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Беннетт Гэвин, Манке Лиза (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-2019184025**

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, примерно 1,31-2,62 мг гидрохлорида гистидина на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли, примерно 15-30 мг сахарозы на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли, и примерно 0,05-0,1 мг полисорбата-20 на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтическая композиция может быть как жидкой, так и твердой. Изобретение также относится к способу лечения распространенной солидной злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией EphA2, включающему внутривенное введение пациенту указанной фармацевтической композиции. Техническим результатом изобретения является предоставление стабильных лиофилизированных препаратов для BT5528, которые могут быть восстановлены для введения.

B1

046145

**046145
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Изобретение претендует на приоритет предварительной заявки на патент США, серийный номер 62/940966, поданной 27 ноября 2019 г., содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгат, содержащий токсин и бициклический пептид (Bicycle) или его фармацевтически приемлемые соли. Настоящее изобретение также относится к применению этих фармацевтических композиций для предупреждения или лечения заболевания, нарушения или состояния, характеризующегося сверхэкспрессией EphA2 в пораженной ткани.

Предпосылки создания изобретения

Циклические пептиды обладают способностью связываться с высокой аффинностью и требуемой специфичностью с белками-мишенями, и поэтому, они являются привлекательным классом молекул для разработки терапевтических препаратов. Фактически, несколько циклических пептидов уже с успехом используются в клинических условиях, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессантное лекарственное средство циклоспорин или противораковое лекарственное средство октреотид (Driggers et al., *Nat Rev Drug Discov* 7 (7), 2008, 608-624). Высокая способность к связыванию является результатом относительно большой поверхности взаимодействия, которая образуется между пептидом и мишенью, а также уменьшенной конформационной гибкостью циклических структур. Как правило, макроциклы связываются с поверхностями в несколько сотен квадратных ангстремов, как например, циклический пептид CVX15, являющийся антагонистом CXCR4 (400 Å²) (Wu et al., *Science* 330, 2007, 1066-1071), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, который связывается с интегрином αVβ3 (355 Å²) (Xiong et al., *Science* 296 (5565), 2002, 151-155), или циклический пептидный ингибитор упаин-1, который связывается с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å²) (Zhao et al., *J Struct Biol* 160 (1), 2007, 1-10).

Благодаря своей циклической конфигурации, пептидные макроциклы являются менее гибкими чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями, и в результате, к более высокой аффинности связывания. Пониженная гибкость приводит также к фиксации специфичных для мишени конформаций, повышая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Это явление продемонстрировано на примере эффективного и селективного ингибитора матриксной металлопротеиназы 8, (MMP-8), который утрачивал свою селективность по сравнению с другими MMP после размыкания его кольца (Cherney et al., *J Med Chem* 41 (11), 1998, 1749-1751). Благоприятные связующие свойства, достигаемые за счет макроциклизации, являются еще более выраженными у мультициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Различные группы исследователей ранее осуществляли связывание полипептидов с помощью остатков цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara *J. Org. Chem.*, 1985; Timmerman et al., *ChemBioChem*, 2005). Melen с соавторами применяли трис(бромметил)бензол и родственные молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации белковой поверхности (Timmerman et al., *ChemBioChem*, 2005). Описаны методы получения лекарственных соединений-кандидатов, с помощью которых создавали указанные соединения, связывая содержащие цистеин полипептиды с молекулярным каркасом, таким как, например ТАТА (1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он), (Heinis et al., *Angew Chem, Int Ed.* 53, 2014, 1602-1606).

Разработаны комбинаторные подходы, основанные на применении фагового дисплея, для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов для представляющих интерес целей (Heinis et al., *Nat Chem Biol* 5 (7), 2009, 502-507 и WO 2009/098450). В целом, метод состоял в следующем: комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области из шести произвольных аминокислот (Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys), экспонировали на фage и осуществляли циклизацию посредством ковалентного связывания боковых цепей цистеина с низкомолекулярным каркасом.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из объектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрохлорид гистидина, сахарозу и полисорбат-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрохлорид гистидина, сахарозу и полисорбат-20, представляет собой лиофилизированный порошок.

Другим объектом настоящего изобретения является способ лечения распространенных (запущенных) форм злокачественных новообразований, ассоциированных с экспрессией EphA2 у пациента, который включает введение пациенту фармацевтической композиции, как здесь описано. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложен способ лечения распространенных форм злокачественных новообразований, ассоциированных с экспрессией EphA2 у пациента, который включает введение пациенту еженедельно с помощью IV-инфузии фармацевтического препарата, содержащего BT5528

или его фармацевтически приемлемую соль, гистидин, сахарозу, полисорбат-20 и воду.

Подробное описание некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения

1. Общее описание некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения.

Были разработаны стабильные лиофилизированные препараты для BT5528, которые могут быть восстановлены для введения. В процессе разработки было установлено, что BT5528 адсорбировался на поверхности флаконов, и что восстановление оказалось сложной задачей. Причину адсорбции BT5528 на поверхности флаконов исследовали во время осуществления отдельных циклов лиофилизации.

В качестве возможных причин рассматривали ряд гипотез, таких как концентрация хлорида натрия в конечном продукте, более щелочное значение pH восстановленного продукта, применение силанизованных флаконов и пересушивание пептида. Каждую из этих гипотез оценивали наряду со скринингом составов, содержащих альтернативные сахара, поверхностно-активное вещество и BT5528 в более низких концентрациях, для выяснения того, улучшало ли это характеристики восстановления. Улучшение времени восстановления было достигнуто при более низком значении pH до лиофилизации, однако на поверхности флакона оставались маслянистые капли. Снижение содержания хлорида натрия, применение силанизованных флаконов и снижение температуры вторичной сушки (для увеличения конечного содержания влаги в продукте) не улучшали характеристики восстановления. Применение альтернативных Сахаров или поверхностно-активного вещества не приводили к улучшению характеристик.

При создании изобретения неожиданно было установлено, что снижение концентрации BT5528 с 4 до 2 мг/мл улучшало характеристики восстановления. Время восстановления снижалось и после восстановления не было обнаружено никаких маслянистых капель на поверхности флаконов. Извлечение по сравнению с теоретическим было на уровне заданного показателя в составе с концентрацией 2 мг/мл по сравнению с составами с концентрацией 4 мг/мл, для которых оно стабильно было ниже заданного показателя.

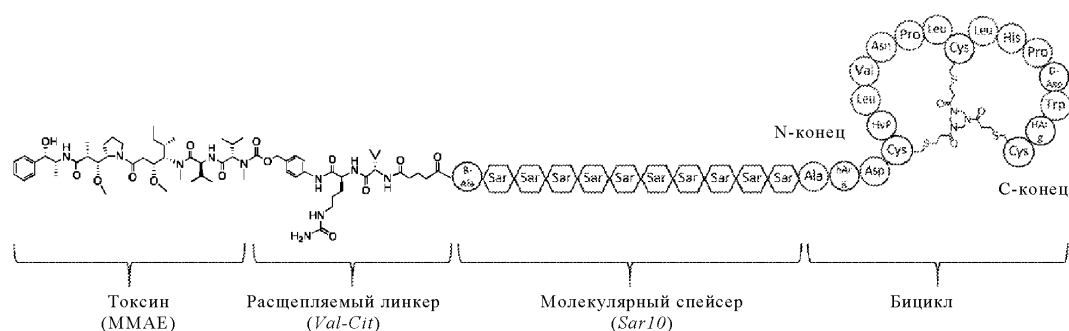
Таким образом, одним из объектов настоящего изобретения является твердая фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, полученная путем удаления растворителя(ей), например, с помощью лиофилизации, из жидкого состава, в котором концентрация BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли составляет примерно 2-4 мг/мл.

Другим объектом настоящего изобретения являются способы применения фармацевтической композиции, как здесь описано, для лечения распространенной солидной злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией EphA2.

2. Соединения и определения.

В контексте настоящего изобретения понятие "BT5528" обозначает конъюгат, содержащий токсин и бициклический пептид (Bicycle), который имеет представленную ниже структуру, в которой молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА), а пептидный лиганд содержит аминокислотную последовательность: $(\beta\text{-Ala})\text{-Sar}_{10}\text{-A(HArg)D-C}_i(\text{HuP})\text{LVNPLC}_{ii}\text{LHP(D-Asp)W(HArg)C}_{iii}$ (SEQ ID NO: 1), в которой Sar обозначает саркозин, HArg обозначает гомоаргинин и HuP обозначает гидроксипролин.

В контексте настоящего изобретения понятие "фармацевтически приемлемая соль" относится к таким солям, которые в рамках принятой медицинской практики пригодны для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п. и характеризуются приемлемым соотношением пользы/риска. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S.M. Berge с соавторами подробно описали фармацевтически приемлемые соли в J. Pharmaceutical Sciences, 66, 1977, 1-19, публикация которой включена в настоящее описание в качестве ссылки. Фармацевтически приемлемые соли соединений настоящего изобретения включают соли, полученные из приемлемых неорганических и органических кислот и оснований. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных кислотно-аддитивных солей являются соли аминокислот, образованные с неорганическими кислотами, такими как соляная кислота, бромистоводородная кислота, фосфорная кислота, серная кислота и перхлорная кислота, или с органическими кислотами, такими как уксусная кислота, щавелевая кислота, малеиновая кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота или малоновая кислота, или с использованием других методов, известных в данной области, таких как ионный обмен. Другие фармацевтически приемлемые соли включают такие соли, как адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, сульфат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидриодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат, ундеканат, валерат и т.п.

**BT5528**

Соли, полученные из соответствующих оснований, включают соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов, аммония и $N+(C_{1-4}алкила)_4$. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают соли натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п. Кроме того, фармацевтически приемлемые соли включают, при необходимости, нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, образованные с использованием противоионов, таких как галогенид, гидроксид, карбоксилат, сульфат, фосфат, нитрат, (низш.)алкилсульфонат и арилсульфонат. Следует понимать, что формы в виде соли подпадают под объем настоящего изобретения, и ссылки на пептидные лиганды включают формы в виде соли указанных лигандов.

Соли согласно настоящему изобретению можно синтезировать из родительского соединения, которое содержит основной или кислотный остаток, общепринятыми химическими методами, такими как методы, описанные в *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002. Как правило, указанные соли можно получать путем взаимодействия форм в виде свободной кислоты или свободного основания указанных соединений с соответствующим основанием или соответствующей кислотой в воде или в органическом растворителе или в смеси этих двух растворителей.

В контексте настоящего изобретения понятие "примерно" должно означать нахождение в пределах 10% от заданной величины или заданного диапазона. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, понятие "примерно" относится к значению, находящемуся в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% от данной величины.

Если не указано иное, то подразумевается также, что структуры, представленные в описании, включают все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры; например, конфигурации R и S для каждого асимметричного центра, изомеры двойной связи Z и E и конформационные изомеры Z и E. Таким образом, одиночные стереохимические изомеры, а также энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные) смеси соединений, представленных в настоящем описании, подпадают под объем изобретения. Если не указано иное, то все таутомерные формы соединений, предлагаемых в изобретении, подпадают под объем изобретения. Кроме того, если не указано иное, то подразумевается также, что структуры, представленные в описании, включают соединения, которые отличаются только присутствием одного или нескольких изотопно обогащенных атомов. Например, соединения, имеющие представленные в настоящем описании структуры, включающие замену водорода дейтерием или тритием, или замену углерода ^{13}C - или ^{14}C -обогащенным углеродом, подпадают под объем настоящего изобретения. Такие соединения можно применять согласно настоящему изобретению, например, в качестве аналитических инструментов, в качестве зондов в биологических анализах или в качестве терапевтических агентов.

3. Фармацевтические композиции.

Одним из объектов настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция содержит примерно 21,2 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой твердую фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, твердая фармацевтическая композиция представляет собой порошок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированный порошок. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, твердая фармацевтическая композиция представляет собой гранулы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкую фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтический препарат (состав) в приемлемом наполнителе или растворителе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, приемлемый наполнитель или растворитель выбирают из стерильной воды,

раствора Рингера, U.S.P. и изотонического раствора хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, приемлемый носитель или растворитель представляет собой стерильную воду. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, приемлемый наполнитель или растворитель представляет собой стерильную среду для инъекций. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция содержит примерно 2-4 мг/мл BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель содержит буферный агент, где буферный агент представляет собой гидрохлорид гистидина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, буферный агент находится в количестве, позволяющем регулировать pH фармацевтической композиции на уровне примерно 6-8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, буферный агент представляет собой гидрохлорид гистидина в количестве примерно 1,31-2,62 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гидрохлорид гистидина присутствует в количестве примерно 1,31 или 2,62 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция содержит гидрохлорид гистидина в концентрации примерно 5,24 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция имеет значение pH примерно 6-8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция имеет значение pH примерно 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения жидкая фармацевтическая композиция имеет значение pH примерно 6,5 или 7,0.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель представляет собой инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель содержит наполнитель или сухой разбавитель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, наполнитель или сухой разбавитель представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель представляет собой связующее вещество. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, связующее вещество представляет собой сахарозу. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель представляет собой сахарозу.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель (например, сахароза) присутствует в количестве примерно 10-35 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель (например, сахароза) присутствует в количестве примерно 15 или 30 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция содержит инертный фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель (например, сахарозу) в концентрации примерно 60 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель содержит поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20) присутствует в количестве примерно 0,01-0,15 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20) присутствует в количестве примерно 0,05 или 0,1 мг на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкая фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20) в концентрации примерно 0,1 или 0,2 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтически приемлемый эксципиент или носитель содержит агент регулирующий изотоничность.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрохлорид гистидина, сахарозу и полисорбат-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическая композиция содержит:

BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль;

примерно 1,31-2,62 мг гидрохлорида гистидина на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 15-30 мг сахарозы на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли; и

примерно 0,05-0,1 мг полисорбат-20 на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена твердая фармацевти-

ческая композиция, которая представляет собой лиофилизированный порошок, содержащий:

примерно 21,2 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 55,5 мг гидрохлорида гистидина на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 636 мг сахарозы на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли; и

примерно 1,06-2,12 мг полисорбат-20 на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена твердая фармацевтическая композиция, которая представляет собой лиофилизированный порошок, содержащий:

примерно 21,2 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 27,8 мг гидрохлорида гистидина на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 318 мг сахарозы на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли; и

примерно 1,06 мг полисорбат-20 на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена жидкая фармацевтическая композиция, содержащая:

примерно 2-4 мг/мл BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;

примерно 5,25 мг/мл гидрохлорида гистидина;

примерно 60 мг/мл сахарозы; и

примерно 0,1-0,2 мг/мл полисорбат-20.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена жидкая фармацевтическая композиция, которую получают путем растворения твердой фармацевтической композиции в воде. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена жидкая фармацевтическая композиция, которую получают путем восстановления твердой фармацевтической композиции в воде с последующим растворением с использованием 5%-ной декстрозы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, жидкую фармацевтическую композицию разводят в IV-пакете с 5% декстрозы для IV-введения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена твердая фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрохлорид гистидина, сахарозу, полисорбат-20. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложена жидкая фармацевтическая композиция, содержащая BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль, гидрохлорид гистидина, сахарозу, полисорбат-20, и воду. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, компоненты фармацевтических композиций присутствуют в указанных выше количествах, концентрациях и соотношениях.

4. Применение фармацевтических композиций.

Одним из объектов настоящего изобретения является способ или применение для лечения распространенной солидной злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией EphA2 у пациента, включающий/включающее введение пациенту фармацевтической композиции, как здесь описано. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, распространенную солидную злокачественную опухоль, ассоциированную с экспрессией EphA2, выбирают из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака желудка/верхних отделов желудочно-кишечного тракта (GI), рака поджелудочной железы и уротелиального рака. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, распространенная солидная злокачественная опухоль, ассоциированная с экспрессией EphA2, представляет собой характерный для аденокарциномы подтип NSCLC (адено-NSCLC).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ включает введение пациенту внутривенно фармацевтической композиции, как здесь описано. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят путем IV-инъекции. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят путем IV-инфузии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, продолжительность IV-инфузии фармацевтической композиции составляет примерно 30-90 мин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, продолжительность IV-инфузии фармацевтической композиции составляет примерно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 мин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, продолжительность IV-инфузии фармацевтической композиции составляет примерно 60 мин.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят пациенту один раз каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят пациенту еженедельно.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 1-27 мг/м². В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 2-20 мг/м². В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 2,2, 4,4, 7,3, 11, 14,6 или 19,4 мг/м². В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 1,5-3,5, 3,5-5,5, 6,5-8,5, 10-12, 13,5-15,5 или 18,5-20,5 мг/м². В неко-

торых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 1-10 или 10-20 мг/м². В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 мг/м².

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, предложено совместное применение фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, и ниволумаба для лечения распространенной солидной злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией EphA2. Ниволумаб можно применять в соответствии с инструкцией, с которой можно ознакомиться на сайте <https://www.opdivohcp.com/dosing/dosing-schedules>, содержание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ниволумаб вводят в количестве 240 мг каждые 2 недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ниволумаб вводят в количестве 480 мг каждые 4 недели. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ниволумаб вводят в виде 30-минутной IV-инфузии.

Примеры

Приведенные ниже Примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие его объем. Если не указано иное, то все аминокислоты использовались в L-конфигурациях.

Пример 1. Получение лиофилизированного лекарственного продукта BT5528.

Сначала проводили оценку процесса, а затем тепловую оценку состава-кандидата. Проводили оценку лиофилизации с изучением связанной с ней стабильности, после чего осуществляли оптимизацию цикла лиофилизации, дополнительный скрининг состава и оценку фильтрации.

1. Оценка процесса получения BT5528 и стабильности после замораживания/оттаивания.

Регистрировала внешний вид, pH, плотность основного раствора и осуществляли анализ BT5528 /сопутствующих субстанций. Дополнительные образцы подвергали трем циклам замораживания (-20°C)/оттаивания, оценивали внешний вид, pH, UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография) и определяли количество субвидимых частиц (MFI, микротоквая визуализация) после каждого цикла.

1.1 Приготовление раствора.

Отвешивали 14 г WFI (вода для инъекций) (70% мас./об.) в небольшой стеклянный стакан, отвешивали и добавляли в него с отмывкой 104 мг гистидина-HCl, затем перемешивали до растворения. После растворения отвешивали 1,2 г сахарозы, после чего добавляли с перемешиванием с помощью магнитной мешалки до растворения. Измеряли pH раствора и доводили до требуемого значения (pH 7,7-8,1). Начальное значение pH составляло 3,42, и его доводили до pH 8,07 с использованием 0,1 М раствора NaOH.

Приготавливали 1% (мас./об.) раствор полисорбата-20 путем растворения 0,5 г полисорбата-20 в 50 мл WFI. Добавляли при перемешивании 400 мкл 1% (мас./об.) раствора полисорбата-20 к раствору гистидина/сахарозы. Отвешивали 86,8 мг BT5528 и медленно добавляли к раствору с постоянным перемешиванием. Полное растворение API (активный фармацевтический ингредиент) происходило примерно через 90 мин.

Измеряли pH раствора и доводили до заданного значения (pH 6,8-7,2). После добавления API pH составляло 7,79, и его доводили до pH 7,19 с помощью 0,1 М раствора HCl. Раствор переносили в 20-миллилитровую мерную колбу и доводили до конечного объема с помощью WFI. Раствор фильтровали через один шприцевой фильтр с мембраной из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,22 мкм. Конечный раствор представлял собой прозрачный бесцветный раствор, не содержащий никаких видимых частиц. Измеренная плотность конечного раствора составляла 1,025 г/см³. Образец до и после фильтрации передавали для аналитического анализа с помощью ЖХВР. Оставшуюся часть основного раствора вносили по 2 мл в стеклянные флаконы вместимостью 2 мл и подвергали трем циклам замораживания/оттаивания.

1.2. Результаты.

1.2.1. Внешний вид и pH.

Не обнаружено существенного изменения внешнего вида или pH в процессе трех циклов замораживания/оттаивания.

Таблица 1-1

Внешний вид раствора и pH

Момент времени/хранение	Внешний вид	pH
До фильтрации	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,2
После фильтрации	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	N/A
Цикл 1 замораживания-оттаивания	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,3
Цикл 2 замораживания-оттаивания	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,3
Цикл 3 замораживания-оттаивания	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,3

1.2.2. Анализ (действующего вещества) и сопутствующих субстанций.

Результаты продемонстрировали отсутствие изменений при анализе действующего вещества или сопутствующих субстанций до и после фильтрации.

Не обнаружено также изменения при анализе действующего вещества или сопутствующих субстанций при оценке при замораживании/оттаивании.

Таблица 1-2

Анализ действующего вещества

Момент времени/хранение	Содержание во флаконе 1 (мг/мл)	Содержание во флаконе 2 (мг/мл)	Среднее содержание (мг/мл)	Извлеч./теор. ¹ (%)	Извлеч./до фильтрации ² (%)
До фильтрации	3.8259	3.8287	3.83	95.68	-
После фильтрации	3.8249	3.8305	3.83	95.69	100.01
Цикл 1 замор./оттаив.	3.8189	3.8102	3.81	95.36	99.67
Цикл 2 замор./оттаив.	3.8021	3.8316	3.82	95.42	99.73
Цикл 3 замор./оттаив.	3.8297	3.8241	3.83	95.67	99.99

¹В % от теоретического значения 4 мг/мл

²В % от результата до фильтрации

Таблица 1-3

Сопутствующие субстанции

RRT	Образец и количество (% площади)				
	До фильтрации	После фильтрации	Цикл замор./оттаив. 1	Цикл замор./оттаив. 2	Цикл замор./оттаив. 3
0.97	0.12	0.13	0.11	0.11	0.11
0.99	2.20	2.18	2.18	2.19	2.16
1.03	0.98	0.97	0.97	0.94	1.00
1.05	0.21	0.22	0.17	0.16	0.20
1.12	0.10	<LOQ	<LOQ	0.10	<LOQ
1.15	0.12	0.12	0.14	0.13	0.13
Всего¹	3.73	3.62	3.57	3.63	3.60

¹Суммарное содержание сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

1.3. Обсуждение и заключение.

Отсутствие снижения количества действующего вещества в процессе фильтрации свидетельствует об отсутствии адсорбции API на PES-мембране. Данные анализа действующего вещества и сопутствующих субстанций свидетельствуют об отсутствии изменения после того, как флаконы подвергали трем циклам замораживания/оттаивания, это демонстрирует, что API является стабильным при осуществлении циклов замораживания/оттаивания.

2. Стадия 3 - оценка тепловых характеристик.

Тепловые характеристики композиции BT5528 оценивали с помощью микроскопии сублимационной сушки (FDM) и дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для идентификации температуры коллапса или любых тепловых явлений, которые могут влиять на разработку цикла лиофилизации.

В табл. 1-4 дано подробное описание композиции. Путем оценки тепловых характеристик композиций действующего вещества и плацебо можно определять параметры цикла сублимационной сушки.

Таблица 1-4

Состав композиции

Компонент	Концентрация (мг/мл)
BT5528	4,0
Гистидин-HCl	5,24
Сахароза	60,0
Полисорбат-20	0,2
Гидроксид натрия	q.s. до заданного pH
WFI	q.s. до 1 мл

2.1. Микроскопия сублимационной сушки (FDM)

Для определения температуры коллапса композиции применяли FDM. Для уточнения установочных параметров цикла FDM анализировали несколько образцов. Каждый анализ осуществляли с использованием 10-кратных объективных линз со светлым полем в проходящем свете. Основные данные, полученные в каждом проведенном анализе, приведены в табл. 1-5.

Таблица 1-5

Данные о тепловых характеристиках, полученные с помощью FDM

Анализ	Замерзание (°C)	Начало коллапса (°C)	Коллапс (°C)
1	-29,5	-32,7	-30,2
2	-28,2	-32,5	-29,3
3	-28,2	-31,7	-30,2
4	-28,2	-31,9	-30,4

В качестве первых признаков коллапса образца были отмечены тонкие изменения в структуре образца, т.е. слабо выраженный фронт высыхания, после чего следовало появление ярких пятен. Эти визуальные наблюдения интерпретировали как начало коллапса. Дальнейшее нарушение структуры проявля-

лось в виде развития более крупных ярких областей, которые распространялись по образцу. Затем эти области образовывали разрыв, что приводило к общему коллапсу. Такое развитие взаимосвязанных ярких областей/разрывов интерпретировали как коллапс продукта.

2.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC).

Помимо FDM, композицию анализировали с помощью DSC, используя параметры, указанные в табл. 1-6. В табл. 1-7 представлено обобщение основных исследуемых параметров.

Таблица 1-6

Заданные параметры для DSC без отжига

Параметр	Заданные значения
Цикл	С 25°C до -50°C со скоростью 1°C/мин, выдерживание при -50°C в течение 10 мин, с -50°C до 25°C со скоростью 1°C/мин
Тигель	Герметически закрытый алюминиевый, 100 мкл
Эталонный образец	Пустой тигель
Параметр	Заданные значения
Продувочный газ	N ₂ , 60 мл/мин
Осушенный газ	N ₂ , 170 мл/мин

Таблица 1-7

Основные параметры, исследуемые на основе DSC-термограмм

Исследуемый параметр	Температура (°C)	
Начало замерзания	-9,69	-18,74
Стеклование/эвтектический расплав	Не обнаружено	Не обнаружено
Начало плавления	-13,21	-10,72

С помощью DSC обнаружены крупные, четко определенные экзотермы замерзания и эндотермы плавления. Не выявлено других заметных тепловых явлений.

2.2.1. Обсуждение и заключение.

Данные, полученные с помощью FDM и DSC, применяли для разработки цикла лиофилизации. Эти температуры представляли собой температуру замерзания и максимально допустимую температуру продукта во время первичной сушки. Температура коллапса композиции составляла примерно -30°C, эта температура должна определять температуру первичной сушки в цикле лиофилизации.

На основе результатов тепловой оценки сделан вывод о том, что в цикле лиофилизации требуется поддержание температуры продукта на 5-10°C ниже температуры коллапса во время первичной сушки, которая в данном случае составляла приблизительно -30°C.

3. Стадия 5 - пробная (тестовая) лиофилизация.

Тепловые характеристики композиции BT5528 определяли на стадии 4, обозначенной как "Оценка тепловых характеристик". Полученные на стадии 4 данные о тепловых характеристиках, свидетельствуют о том, что температура коллапса составляла примерно -30°C.

На основе этих данных был разработан пробный цикл лиофилизации, подробно описанный в таблице 1-8, для поддержания температуры продукта на 5-10°C ниже температуры коллапса. Подготавливали достаточное количество флаконов для проведения исследования стабильности лиофилизованного продукта, подробно описанного в табл. 1-9, и оценки стабильности при восстановлении. Для заполнения 2-миллилитровых прозрачных стеклянных флаконов типа I использовали 1 мл раствора с концентрацией 4 мг/мл. Лиофилизированный продукт следует восстанавливать с помощью 1 мл WFI для достижения заданной концентрации 4 мг/мл. Область, непосредственно окружающую флаконы с действующим веществом, заполняли флаконами, содержащими 1 мл буферного раствора, для более точной имитации условий полностью заполненной камеры.

3.1. Приготовление раствора.

Добавляли ~80 мл WFI (конечный объем ~70% (мас./об.)) в стеклянный стакан, в который добавляли 628,8 мг гистидина-HCl и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 7,2 г сахарозы и добавляли при перемешивании в раствор, содержащий WFI/гистидин, до растворения. Измеряли pH раствора и доводили до заданного значения (pH 7,7-8,1) с помощью 0,1M гидроксида натрия. Начальное значение pH составляло 3,93, и его доводили до pH 7,74.

Приготавливали 1% (мас./об.) раствор полисорбата-20 путем растворения 0,5 г полисорбата-20 в 50 мл WFI. 2,4 мл 1%-ного (мас./об.) раствора полисорбата-20 добавляли при перемешивании к раствору гистидина/сахарозы. Отвешивали 615 мг BT5528 и медленно добавляли к раствору при постоянном перемешивании. Полное растворение BT5528 происходило примерно через 120 мин. После перемешивания в течение 90 мин обнаружено прилипание API и ко дну, и к стенкам стакана. После перемешивания в течение еще 30 мин получали бесцветный раствор без видимых частиц.

Измеряли pH раствора и доводили до заданного значения (pH 6,8-7,2) с помощью 0,1 M соляной кислоты. Значение pH составляло 7,83 после добавления API и его доводили до pH 7,10 с помощью 0,1M раствора HCl. Раствор переносили в 100-миллилитровую и 20-миллилитровую мерную колбу, никогда не заполняя полностью, и доводили до конечного объема с помощью WFI, после чего возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

Образец раствора отбирали перед фильтрацией, в остальную часть фильтровали через шприцевой

фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, после фильтрации образец отбирали для анализа. Фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

3.2. Лиофилизация.

Раствором объемом 1 мл заполняли 2-миллилитровые флаконы и неплотно закупоривали с помощью 13-миллиметровых пробок, применяемых при сублимационной сушки. Один флакон, расположенный в центре и спереди, отбирали для мониторинга температуры продукта на протяжении всего цикла. Область вокруг флаконов заполняли флаконами объемом по 2 мл, содержащими 1 мл раствора плацебо. Флаконы лиофилизировали, используя цикл, указанный в табл. 1-8.

Мониторинг хода цикла осуществляли на основе определения температуры на полке и температуры продукта (датчики терморпары) и давления в камере, измеренного манометром Пирани и емкостным манометром.

Таблица 1-8

Цикл лиофилизации					
Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-25	100	75	0,20
7	Первичная сушка	-25	100	3701	N/A
8	Изменение температуры	25	20	250	0,20
9	Вторичная сушка	25	20	866	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого) азота			
Общая продолжительность цикла ~89 ч (~3,7 дня)					

Лиофилизованная спрессованная масса имела белый цвет, она оказалась хорошо сформированной, без признаков коллапса. Наблюдалась усадка относительно высоты заполнения, однако не было никаких признаков того, что это повлияло на структуру лиофилизованной спрессованной массы.

Лиофилизированный продукт помещали на хранение для изучения стабильности и тестировали в течение 1 месяца (согласно табл. 1-9) при ускоренном хранении при 25°C/относительной влажности (RH) 60%. У лиофилизованного продукта оценивали внешний вид, содержание влаги, а также анализировали содержание действующего вещества и сопутствующих субстанций с помощью UPLC. Восстановленный продукт оценивали на основе времени восстановления, внешнего вида раствора, pH и субвидимых частиц (только при T = 0).

Таблица 1-9

Оценка высушенного продукта				
Тест	T=0 (недели)	T=1 (недели)	T=2 (недели)	T=4 (недели)
UPLC перед лиофилизацией (pre-lyo)	√	п.а.	п.а.	п.а.
Титрование по Карлу Фишеру	√	-	√	√
UPLC	√	√	√	√
Время восстановления ¹	√	-	√	√
pH восстановленного продукта ¹	√	-	√	√
Субвидимые частицы	√	-	-	-

¹Восстановление с использованием 1 мл WFI

3.3. Результаты.

3.3.1. Внешний вид лиофилизата.

Данные о внешнем виде лиофилизата в процессе исследования стабильности представлены в табл. 1-10.

Таблица 1-10

Внешний вид лиофилизата, 001/BCL/18

Момент времени/хранение		Внешний вид
Начальный (T=0)		Белая лиофилизированная лепешка с признаками легкой усадки
25°C/60% RH	T=1 неделя	
	T=2 недели	Белая лиофилизированная лепешка с признаками усадки
	T=4 недели	Белая лиофилизированная лепешка с признаками усадки

Таблица 1-11

Внешний вид, время восстановления и pH, 001/BCL/18

Момент времени/хранение		Время восстан. (с)	Внешний вид	pH
Начальный (T=0)		108 ¹	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,1
25°C/60% RH	T=1 неделя	-	-	-
	T=2 недели	529 ²	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,1
	T=4 недели	386 409	Прозрачный бесцветный раствор, на дне флакона обнаружены крапинки	7,1

¹При восстановлении на дне флакона была видна густая белая пена. Это необходимо отслеживать в последующие моменты времени.

²При восстановлении флакон вращали в течение нескольких минут перед его помещением на полку на оставшийся период времени. На дне флакона были обнаружены небольшие маслянистые пятна, не обнаружено твердое вещество белого цвета.

³При восстановлении флакон вращали в течение нескольких минут перед его помещением на полку на оставшийся период времени. На дне флакона все еще были обнаружены прилипшие крапинки потенциального продукта. Затем использовали другой флакон для осуществления эксперимента по восстановлению. Этот флакон выдерживали в течение 30 мин, однако крапинки все еще присутствовали. В процессе анализа восстановления осуществляли фотографирование на каждой стадии вращения и осаждения, однако оказалось затруднительным продемонстрировать присутствие крапинок из-за малого объема содержимого.

3.3.3. Содержание влаги.

Таблица 1-12

Содержание влаги, 001BCL/18

Момент времени/хранение		Влажность (%)
Начальный (T=0)		1,94 ¹
25°C/60% RH	T=1 неделя	-
	T=2 недели	1,44
	T=4 недели	2,11 ¹

¹В моменты времени T=0 и T=4 недели обнаружена значительная вариабельность в содержании влаги. По этому поводу в момент времени T=0 вступали в контакт с заказчиками. Вариации могли быть обусловлены различиями в положении флакона в сублимационной сушилке и различиями в объемах при заполнении вручную.

3.3.3.4. Субвидимые частицы.

Таблица 1-13

Субвидимые частицы, 001/BCL/18

Момент времени/хранение		Количество/флакон ¹		Соответствует/не соответствует ²
		≥10 мкм	≥25 мкм	
Начальный (T=0)		45	1	Соответствует
25°C/60% RH	T=1 неделя	-	-	-
	T=2 недели	-	-	-
	T=4 недели	-	-	-

¹при объеме заполнения 1 мл

²количество частиц с диаметром ≥10 мкм на флакон <6000 обозначено понятием «соответствует» и количество частиц с диаметром ≥25 мкм на флакон <600 обозначено понятием «соответствует»

3.3.5. Анализ до лиофилизации (Pre-Lyo-анализ).

Таблица 1-14

Анализ до и после фильтрации основного раствора, 001/BCL/18

Момент времени/хранение	Содержание (мг/мл)	Извлечение/теор. ¹ (%)	Извлечение/до фильтрации ² (%)
До фильтрации	3,79	94,8	-
После фильтрации	3,65	91,3	96,3

¹В процентах от теоретического значения 4 мг/мл

²В процентах от результата до фильтрации

3.3.6. Сопутствующие субстанции до лиофилизации

Таблица 1-15

Сопутствующие субстанции до и после лиофилизации

RRT	Образец и количество (% площади)	
	До фильтрации	После фильтрации
0.96	0.36	0.26
0.96	1.65	1.61
1.07	0.58	0.51
1.08	0.38	0.36
1.20	0.11	0.14
1.27	0.16	0.11
1.29	0.13	0.11
Всего ¹	3.37	3.10

¹сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

3.3.7. Анализ содержимого флаконов

Таблица 1-16

Анализ, 001/BCL/18

Момент времени/хранение	Флакон 1 (мг/мл)	Флакон 2 (мг/мл)	Средн. содержание (мг/флакон)	Извлеч./теор. ¹ (%)	Извлеч./T ² (%)	
Начальный (T=0)	3.7302	3.7607	3.75	93.6	-	
25°C/60%RH	T=1 неделя	3.7816	3.7132	3.75	93.7	99.9
	T=2 недели	3.8873	3.7879	3.84	95.9	102.3
	T=4 недели	3.8077	3.8044	3.81	95.2	101.5

¹в процентах от теоретического значения 5 мг/мл

²в процентах от начального (T=0) результата

3.3.8. Сопутствующие субстанции

Таблица 1-17

Чистота/сопутствующие субстанции (% площади), 25°C/60%RH

RRT	Момент времени и количество (%)			
	Начальный (T=0)	1 неделя	2 недели	4 недели
0.96	0.31	0.10	<LOQ	0.28
0.98	1.65	1.30	1.46	1.59
1.07	0.58	0.69	ND	0.49
1.08	0.39	0.53	0.66	0.75
1.14	ND	ND	0.14	ND
1.27	0.14	ND	ND	0.13
1.28	0.12	0.21	0.21	0.16
1.43	ND	ND	ND	0.11
Всего ¹	3.19	2.83	2.47	3.51

¹сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

3.3.9. Обсуждение и заключение.

Установлено, что параметры цикла, применявшиеся при осуществлении пробной лиофилизации, пригодны для основного состава; лиофилированная спрессованная масса во флаконе имела белый цвет и небольшую усадку. Не обнаружены изменения внешнего вида лиофилированной спрессованной массы во флаконе при изучении стабильности в течение 4 недель при 25°C/60%RH. Значение pH восстановленного раствора сохранялось на уровне pH 7,1 в процессе всего исследования, однако обнаружена вариабельность во времени восстановления и отмечено появление маслянистых пятен на поверхности флаконов. Процедура восстановления и оценка внешнего вида восстановленного продукта нуждается в дополнительной оценке в процессе оптимизации цикла лиофилизации.

Величины, установленные при анализе содержимого флаконов, оставались неизменными в течение 4-недельного исследования стабильности, но следует отметить, что концентрация составляла 93-95% от теоретической. Поскольку результат, полученный до фильтрации, также оказался низким, можно предположить наличие адсорбции API на стеклянной посуде во время приготовления, в отличие от потерь при фильтрации.

Данные о количестве сопутствующих субстанций оказались сопоставимыми в моменты времени T = 0 и T = 4 недель и составляли 3,19% и 3,51% соответственно, однако для данных о сопутствующих субстанциях характерна некоторая вариабельность - от 2,47 до 3,51%.

Установлено, что основной состав обладал стабильностью при хранении при 25°C/60% RH, и поэтому использовался далее для оптимизации цикла лиофилизации.

4. Стадия 6 - оптимизация цикла лиофилизации.

Данные о стабильности лиофилированного продукта, полученные при осуществлении пробного цикла лиофилизации, продемонстрировали, что продукт обладал стабильностью при хранении при 25°C/60% RH. В первом цикле оптимизации использовали температуру на полке для первичной сушки, составляющую -20°C, с целью сокращения продолжительности первичной сушки.

Заполняли небольшое количество флаконов (18) для получения количества флаконов, достаточного для тестирования лиофилированного продукта и оценки стабильности после восстановления.

Раствором с концентрацией 4 мг/мл, используя объем 5,3 мл, заполняли 10-миллилитровые про-

зрачные стеклянные флаконы типа I. Лиофилизированный продукт восстанавливали с помощью 5,3 мл WFI для достижения заданной концентрации 4 мг/мл.

Для решения вопроса о том, может ли применение гидрофобного покрытия предупреждать адсорбцию продукта на поверхности флакона, обнаруженную при изучении стабильности при лиофилизации, применяли также 2-миллилитровые флаконы TopLyо™. Небольшое количество флаконов (5 штук) заполняли объемом 0,5 мл и осуществляли лиофилизации в этом же цикле.

4.1. Первый цикл оптимизации лиофилизации.

4.1.1. Приготовление раствора.

Приготавливали 150 мл основного раствора следующим образом.

Добавляли примерно 100 мл WFI в 200-миллилитровый стакан, содержащий стержень магнитной мешалки, в него добавляли с отмывкой 786,3 мг гистидина-HCl и перемешивали до растворения, происходящего в течение 5 мин.

После растворения отвешивали 9,0004 г сахарозы и добавляли с отмывкой в стакан при перемешивании с помощью магнитной мешалки до растворения. Раствор перемешивали в течение 5 мин вплоть до полного растворения сахарозы.

Измеряли pH раствора и доводили до заданного значения pH 7,7-8,1 с помощью 1M гидроксида натрия перед добавлением 3 мл 1% (мас./об.) полисорбата-20. Раствор перемешивали в течение 5 мин до гомогенного состояния.

Отвешивали 651 мг VT5528 и медленно добавляли с отмывкой в сосуд для получения готового продукта. Раствор перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 90 мин, при этом обнаружены небольшие количества API, адсорбированные на поверхности стакана. Следует отметить, что, по-видимому, агломерация API происходит первоначально во время процесса растворения перед полным растворением.

Измеряли pH раствора и доводили до pH 7,03 с помощью 0,1M HCl (заданное значение pH 6,8-7,2). Затем раствор переносили в 100-миллилитровую и 50-миллилитровую мерную колбу, никогда не заполняя полностью, и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Раствор возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

Раствор фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, до и после фильтрации образцы отбирали для анализа. Полученный фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

4.1.2. Лиофилизация.

Раствором, взятом в объеме 5,3 мл, заполняли 10-миллилитровые прозрачные стеклянные флаконы типа I, кроме того, раствором, взятом в объеме 0,5 мл, заполняли как стандартные флаконы, так и TopLyо™ (силанизированные флаконы) для решения вопроса о том, может ли применение гидрофобной поверхности снижать адсорбцию VT5528 на поверхности флакона.

Один флакон, расположенный в центре лотка, отбирали для мониторинга температуры продукта на протяжении всего цикла. Ход цикла контролировали на основе температуры (датчик полки/продукта) и давления в камере (емкостный манометр/манометр Пирани) для определения конечной точки первичной и вторичной сушки.

Флаконы лиофилизировали непосредственно на полке, используя цикл, описанный в табл. 1-18.

Таблица 1-18

Цикл лиофилизации

Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-20	100	100	0,20
7	Первичная сушка	-20	100	4658	N/A
8	Изменение температуры	25	20	225	0,20
9	Вторичная сушка	25	20	368	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого)азота			
Общая продолжительность цикла ~96,2 ч (~4 дня)					

Лиофилизированная спрессованная масса имела белый цвет, оказалась хорошо сформированной и имела небольшую усадку. Усадка, по-видимому, являлась неотъемлемой особенностью состава, поскольку это также имело место в цикле пробной лиофилизации при температуре первичной сушки -25°C.

Лиофилизированная спрессованная масса во флаконах TopLyо™ характеризовалась общим коллапсом и поэтому не представлялось возможным протестировать продукт. Коллапс, по-видимому, связан с увеличенным временем высыхания при объеме заполнения 5,3 мл флакона объемом 10 мл по сравнению с объемом заполнения 0,5 мл флакона объемом 2 мл, что приводило к повышению температуры продукта выше температуры коллапса.

4.1.3. Результаты.

Подробное описание партии продукта представлены в табл. 1-19. Партию 002/BCL/18 лиофилизировали с использованием первого цикла оптимизации.

Таблица 1-19

Композиция продукта, представляющего собой лекарственное средство
(номер партии и подробное описание состава)

002/BCL/18	4 мг/мл BT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон)
------------	--

4.1.3.1. Внешний вид раствора, pH и время восстановления.

Таблица 1-20

Внешний вид раствора, pH и время восстановления

Образец	Внешний вид	pH	Время восстановления (мин)
002/BCL/18	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,1	12,03 ¹

¹для восстановления требовалось интенсивное встряхивание. После указанного периода времени не оставалось крупных сгустков, однако все еще обнаруживались маслянистые отложения материала, что позволяет предположить наличие прилипания продукта флакону, см. фиг. 1. Для достижения полного растворения требовалось вихревое перемешивание.

Таблица 1-21

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы

Образец	Внешний вид
002/BCL/18	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой

4.1.3.2. Субвидимые частицы.

Таблица 1-22

Субвидимые частицы

Образец	10 мкм (количество/флакон)	25 мкм (количество/флакон) ¹	Соответствует/не соответствует ²
002/BCL/18	173	4	Соответствует

¹При объеме заполнения 5,3 мл

²Количество частиц с диаметром ≥ 10 мкм на флакон ≤ 6000 обозначают понятием «соответствует» и количество частиц с диаметром ≥ 25 мкм на флакон ≤ 600 обозначают понятием «соответствует»

4.1.3.3. Содержание влаги.

Таблица 1-23

Содержание воды

Образец	Среднее содержание воды (мас.%)
002/BCL/18	2,50

4.1.3.4. Анализ содержимого флакона.

Таблица 1-24

Анализ

Образец		Анализ до фильтрации (мг/мл)	Анализ после фильтрации (мг/мл)	Извлечение после фильт./теор. ¹ (%)	Анализ (мг/мл)	Извлечение/теор. ¹	Извлечение/после фильтрации ² (%)
002/BCL/18	Флакон 1	4,2092	4,0521	96,27	4,2369	105,92	104,56
	Флакон 2				4,1854	104,63	103,29

¹В процентах от теоретического значения 4 мг/мл

²В процентах от результата после фильтрации

4.1.3.5. Чистота/сопутствующие субстанции.

Чистота/сопутствующие субстанции

RRT	Образец и количество (% площади/площадь)		
	До фильтрации	После фильтрации	002/BCL/18
0.97	0.92	0.90	0.86
0.98	1.78	1.40	1.75
BT5528	96.07	96.40	96.17
1.09	0.76	0.85	0.78
1.16	0.13	0.14	0.11
1.27	0.11	0.10	0.12
1.30	0.16	0.15	0.15
Всего ¹	3.86	3.54	3.77

¹ Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

4.1.4. Обсуждение и заключение.

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы свидетельствовал о том, что температура первичной сушки -20°C являлась пригодной для основного состава, что поддерживало температуру продукта на уровне ниже температуры коллапса на начальных стадиях первичной сушки. Температура превышала температуру коллапса к концу первичной сушки по мере того, как сушка приближалась к завершению. Можно рекомендовать во втором цикле оптимизации дополнительно повышать температуру первичной сушки до -15°C , для того, чтобы не было никаких признаков коллапса продукта.

Восстановление лиофилизированного продукта оказалось таким же, как и при пробной лиофилизации продукта, с образованием маслянистых капель и с необходимостью в вихревом перемешивании для восстановления. Применение вихря приводило к чрезмерному вспениванию продукта из-за присутствия в составе полисорбата 0. Время восстановления составляло примерно 12 мин, что превышало заданное время, составляющее 10 мин.

Результаты анализа действующего вещества находились на заданном уровне, что свидетельствует об отсутствии потери API из-за адсорбции на стеклянной посуде во время приготовления или в процессе фильтрации. Данные о чистоте /сопутствующих субстанциях после лиофилизации оказались сходными с полученными до и после фильтрации.

4.2. Второй цикл оптимизации лиофилизации.

В первом цикле оптимизации использовали температуру на полке для первичной сушки -20°C , что сокращало продолжительность первичной сушки. Лиофилизированный продукт имел белый цвет, оказался хорошо сформированным без признаков коллапса. Поэтому для второго цикла лиофилизация было рекомендовано повышать температуру на полке до -15°C , для дополнительного сокращения продолжительности первичной сушки.

Заполняли небольшое количество флаконов (18) для обеспечения достаточного количества флаконов для тестирования.

Раствором с концентрацией 4 мг/мл, взятом в объеме 5,3 мл, заполняли 10-миллилитровые прозрачные стеклянные флаконы типа I. Лиофилизированный продукт восстанавливали с помощью 5,3 мл WFI до достижений заданной концентрации 4 мг/мл.

Для решения вопроса о том, может ли применение гидрофобной поверхности снижать адсорбцию продукта на поверхности флакона, что обнаружено при изучении стабильности при пробной лиофилизации, применяли 2-миллилитровые флаконы TopLyо™. Небольшое количество флаконов (5), заполняли раствором, используя объем 0,5 мл, и лиофилизировали в этом же цикле. Заполняли также небольшое количество 2-миллилитровых флаконов без покрытия для сравнения с флаконами TopLyо™, поскольку при осуществлении первого цикла оптимизации обнаружен коллапс продукта, поэтому осуществить оценку воздействия силанизированного покрытия оказалось невозможным.

4.2.1. Приготовление раствора.

120 мл основного раствора приготавливали следующим образом:

добавляли примерно 80 мл WFI в 200-миллилитровый стакан, содержащий стержень магнитной мешалки, в него добавляли с отмывкой 628,8 мг гистидина-HCl и перемешивали до растворения, происходящего в течение 5 мин.

После растворения отвешивали 7,2 г сахарозы и добавляли с отмывкой в стакан при перемешивании с помощью магнитной мешалки до растворения. Раствор перемешивали в течение 5 мин вплоть до полного растворения сахарозы.

Измеряли pH раствора и доводили до заданного значения pH 7,7-8,1 с помощью 1M гидроксида натрия перед добавлением 2,4 мл 1% (мас./об.) полисорбата-20. Раствор перемешивали в течение 5 мин до гомогенного состояния.

Отвешивали 651 мг BT5528 и медленно добавляли с отмывкой в сосуд для получения готового продукта. Раствор перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 120 мин, после перемешивания в течение 90 мин обнаружены небольшие количества API, адсорбированные на поверхности дна стакана, а также на стержне магнитной мешалки. После перемешивания в течение дополнительного промежутка времени получали бесцветный раствор без частиц.

Измеряли pH раствора и доводили до pH 7,1 (заданное значение pH 6,8-7,2). Затем раствор переносили в 100-миллилитровую и 20-миллилитровую мерную колбу, никогда не заполняя полностью, и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Раствор возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

Раствор фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, до и после фильтрации отбирали образцы для анализа. Полученный фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

4.2.2. Лиофилизация.

Один флакон, расположенный в центре лотка, отбирали для мониторинга температуры продукта на протяжении всего цикла. Ход цикла контролировали на основе температуры (датчик полки/продукта) и перепадов давления в камере (емкостный манометр/манометр Пирани) для определения конечной точки первичной и вторичной сушки.

Флаконы лиофилизировали непосредственно на полке, используя цикл, описанный в табл. 1-26. Из-за неисправности датчика продукта данные о температуре не были получены во время цикла лиофилизации. Сходимость данных, полученных с использованием манометра Пирани и емкостного манометра, использовалась для определения завершения первичной и вторичной сушки.

Таблица 1-26

Цикл лиофилизации

Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-15	100	125	0,20
7	Первичная сушка	-15	100	300	N/A
8	Изменение температуры	25	20	250	0,20
9	Вторичная сушка	25	20	866	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого) азота			
Общая продолжительность цикла ~89 ч (~3,7 дня)					

4.2.3. Результаты.

Подробное описание партии продукта представлено в табл. 1-28.

Таблица 1-27

Композиция продукта, представляющего собой лекарственное средство (номер партии и подробное описание состава)

003/BCL/18	4 мг/мл ВТ5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон)
------------	--

4.2.3.1. Внешний вид раствора, pH и время восстановления.

Таблица 1-28

Внешний вид раствора, pH и время восстановления

Образец	Внешний вид	pH	Время восстановления (мин)
003/BCL/18	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	6,7	11,14 ¹

¹ Для восстановления требовалось интенсивное встряхивание. После указанного периода времени не оставалось крупных сгустков, однако все еще были обнаружены маслянистые отложения материала, что позволяет предположить наличие прилипания продукта к флакону. Для достижения полного растворения требовалось вихревое перемешивание.

Таблица 1-29

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы

Образец	Внешний вид
003/BCL/18	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой

4.2.3.2. Субвидимые частицы.

Таблица 1-30

Субвидимые частицы

Образец	10 мкм	25 мкм	Соответствует/не соответствует ²
	(количество/флакон) ¹	(количество/флакон) ¹	
003/BCL/18	209	4	Соответствует

¹При объеме заполнения 5,3 мл

²Количество частиц с диаметром ≥ 10 мкм на флакон ≤ 6000 обозначают понятием «соответствует» и количество частиц с диаметром ≥ 25 мкм на флакон ≤ 600 обозначают понятием «соответствует»

4.2.3.3. Содержание влаги.

Таблица 1-31

Содержание воды

Образец	Среднее содержание воды (мас.%)
003/BCL/18	2,13

4.2.3.4. Анализ содержимого флакона.

Таблица 1-32

Анализ (действующего вещества)

Образец		Анализ до	Анализ	Извлечение	Анализ	Извлечение/	Извлечение/
		фильтрации	после	после	(мг/мл)	теор. ¹	после
		(мг/мл)	фильтрации	фильтрации/			фильтрации ²
			(мг/мл)	теор. ¹ (%)			(%)
003/BCL/18	Флакон 1	3,9008	3,9849	98,57	102,16	21,4138	4,0403
	Флакон 2					22,6418	4,2720

¹В процентах от теоретического значения 4 мг/мл

²В процентах от результата после фильтрации

4.2.3.5. Чистота/сопутствующие субстанции.

Таблица 1-33

Чистота/сопутствующие субстанции, партия 003/BCL/18

RRT	Количество (%площади/площадь)		
	До фильтрации	После фильтрации	003/BCL/18
0.96	0.19	0.19	0.18
BT5528	98.89	98.85	98.83
1.12	0.72	0.81	0.77
Всего ¹	0.91	1.00	1.05

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

4.1.4. Обсуждение и заключение.

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы свидетельствовал о том, что температура первичной сушки -15°C является пригодной для основного состава и температура продукта поддерживалась на уровне ниже температуры коллапса на начальных стадиях первичной сушки. Температура превышала температуру коллапса к концу первичной сушки по мере того, как сушка приближалась к завершению.

Восстановление лиофилизированного продукта оказалось таким же как и при пробной лиофилизации продукта с образованием маслянистых капель и с необходимостью в вихревом перемешивании для восстановления. Применение вихря приводило к чрезмерному вспениванию продукта из-за присутствия полисорбата -20 в составе. Время восстановления составляло примерно 11 мин, что превышало заданное время, составляющее 10 мин.

Восстановление лиофилизированной спрессованной массы во флаконах TopLyо™ оказалось более длительным по сравнению с восстановлением в стандартных 2-миллилитровых прозрачных стеклянных флаконах типа I, и при этом была обнаружена более выраженная адсорбция API на поверхности. Это свидетельствует о том, что использование силанизированных флаконов не улучшало восстановление или показатели извлечения лиофилизированного продукта.

Результаты анализа действующего вещества находились на заданном уровне, что свидетельствует об отсутствии потери API из-за адсорбции на стеклянной посуде во время приготовления или в процессе фильтрации. Данные о чистоте/сопутствующих субстанциях после лиофилизации оказались сходными с данными, полученными до и после фильтрации, однако следует отметить, что общее количество сопутствующих субстанций было значительно меньше, чем в первом цикле оптимизации.

Данные о содержании влаги в этом цикле оказались сходными (2,13 мас.%) с данными, полученными в первом цикле оптимизации лиофилизации (2,50 мас.%).

Оценку восстановления лиофилизированного продукта в 10-миллилитровых флаконах (21,2 мг BT5528/флакон) осуществляли с использованием кислого раствора. Поскольку BT5528 представляет собой щелочной белок, то, вероятно, регулирование pH должно улучшать восстановление. Высказана гипотеза о том, что восстановление не с помощью WFI, а с помощью разбавленной кислоты для достижения более низкого значения pH буфера должно повышать скорость солиubilизации после восстановления. Улучшенное восстановление при использовании кислого раствора может свидетельствовать о том, что

изменение заданного значения pH состава перед лиофилизацией до более низкого значения (например, до pH 6 или 6,5 по сравнению с имеющимся pH 7,1) улучшает восстановление лиофилизированного продукта по сравнению с восстановлением при использовании только WFI.

Отдельные флаконы с лиофилизированным BT5528-продуктом восстанавливали с использованием 5,3 мл либо 0,01 М HCl, либо 0,02 М HCl и внешний вид оценивали в течение 15 мин. Время восстановления и внешний вид восстановленного продукта касательно образования маслянистых капель улучшались при использовании 0,02М раствора HCl. Это позволяет предположить, что более кислое значение pH лиофилизированного продукта может улучшать характеристики восстановления.

Вторая гипотеза заключалась в том, что проблемы при восстановлении связаны с высокой концентрацией соли в составе в результате процесса приготовления продукта. Для регулирования pH с ~pH 3,5 до pH 7,7-8,1 перед растворением API применяли гидроксид натрия с последующим применением соляной кислоты для регулирования pH до заданного значения pH 6,8-7,2.

5. Оценка влияния гистидина/pH.

Применение кислого раствора для восстановления улучшало время восстановления и внешний вид. Для изучения вопроса о том, может ли более низкое значение pH до лиофилизации улучшать время восстановления и результаты анализа, приготавливали три раствора с pH 6, pH 6,5 и pH 7,0, лиофилизировали их с использованием цикла, указанного в таблице 36, затем анализировали после лиофилизации.

Кроме того, изменяли процесс получения продукта для снижения использования гидроксида натрия для регулирования pH и содержания хлорида натрия в конечном продукте. pH растворов, полученных перед добавлением BT5528, не регулировали и их регулировали только после растворения API.

Составы представлены в таблице 1-34.

Таблица 1-34

Составы содержащих гистидин композиций/pH (номер партии и подробное описание состава)

Состав 1	4 мг/мл BT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCl, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20, pH 6
Состав 2	2 мг/мл BT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCl, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20, pH 6,5
Состав 3	2 мг/мл BT5528, 5,24 мг/мл гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата-20, pH 7

5.1. Приготовление раствора.

Ниже представлены подробности приготовления раствора каждого из составов.

Состав 1 - Гистидин-HCl - pH 6.

Добавляли примерно 35 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой 262,1 мг гистидина-HCl и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 3,0322 г сахарозы и добавляли с отмывкой, затем перемешивании до растворения. С помощью пипетки добавляли 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата -20 в раствор гистидина/сахарозы и перемешивали вплоть до полного растворения. Измеренное значение pH раствора составляло 4,01.

Отвешивали 258 мг BT5528 и медленно добавляли, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Измеряли pH раствора и доводили до pH 6,02 с помощью 1М гидроксида натрия, после чего переносили в 50-миллилитровую мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Раствор возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

Раствор фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

Состав 2 - гистидин-HCl - pH 6,5.

Добавляли примерно 35 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой 262,2 мг гистидина-HCl и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 3,0360 г сахарозы и добавляли с отмывкой, затем перемешивании до растворения. С помощью пипетки добавляли 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата -20 в раствор гистидина/сахарозы и перемешивали вплоть до полного растворения. Измеренное значение pH раствора составляло 4,01.

Отвешивали 257 мг BT5528 и медленно добавляли, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Измеряли pH раствора и доводили до pH 6,49 с помощью 1М гидроксида натрия, после чего переносили в 50-миллилитровую мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Раствор возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси. Раствор фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

Состав 3 - гистидин-HCl - pH 7.

Добавляли примерно 35 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой 262,0 мг гистидина и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 3,0439 г сахарозы и добавляли с отмывкой, затем перемешивании до растворения. С помощью пипетки добавляли 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата -20 в раствор гисти-

дина/сахарозы и перемешивали вплоть до полного растворения. Измеренное значение pH раствора составляло 7,73.

Отвешивали 257 мг ВТ5528 и медленно добавляли, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Измеряли pH раствора и доводили до pH 6,97 с помощью 1М соляной кислоты, после чего переносили в 50-миллилитровую мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Раствор возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси. Раствор фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

5.2. Лиофилизация.

Каждый из трех полученных составов вносили в 10-миллилитровые прозрачные стеклянные флаконы типа I, используя объем заполнения 5,3 мл.

Флаконы помещали в центр лотка сублимационной сушилки и лиофилизировали непосредственно на полке с использованием цикла, описанного в табл. 1-35. Ход цикла контролировали на основе температуры (датчик полки/продукта) и перепадов давления в камере (емкостный манометр/манометр Пирани) для определения конечной точки первичной и вторичной сушки.

Таблица 1-35

Цикл лиофилизации

Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание ¹	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-15	100	125	0,20
7	Первичная сушка	-15	100	3739	N/A
8	Изменение температуры	25	20	200	0,20
9	Вторичная сушка	25	20	904	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого) азота			
Общая продолжительность цикла ~90 ч (~3,7 дня)					

5.3. Результаты.

5.3.1. Внешний вид раствора, pH и время восстановления.

Для восстановления потребовалось энергичное встряхивание. По истечении указанного времени больших комков не оставалось, однако прилипание материала к стенкам флакона все еще можно было обнаружить, что позволяло предположить налипание продукта на флакон. Для получения полного растворения требовалось вихревое перемешивание.

Таблица 1-36

Внешний вид раствора, pH и время восстановления

Образец	Внешний вид	pH	Время восстановления (мин)
Гистидин-HCl pH 6,0	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	6,0	3 мин 04 с
Гистидин-HCl pH 6,5	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	6,5	6 мин 04 с
Гистидин pH 7,0	Прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц	7,0	8 мин 38 с

Таблица 1-37

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы

Образец	Внешний вид
Гистидин-HCl pH 6,0	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой
Гистидин-HCl pH 6,5	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой
Гистидин pH 7,0	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой

5.3.2. Анализ (содержимое флакона).

Таблица 1-38

Анализ

Образец	Анализ до фильтрации (мг/мл)	Анализ после фильтрации (мг/мл)	После извлечения/теор ¹ (%)	После извлечения/до фильтрации (%)	Анализ (мг/флакон)	Извлечение/теор ¹ (%)	Извлеч./после фильтрации ² (мг/мл)	
								Флакон 1
pH 6.0	Флакон 1	4.3353	4.3047	107.62	99.29	3.8921	97.30	90.42
	Флакон 2							91.78
pH 6.5	Флакон 1	4.2583	4.2805	107.01	100.52	3.8813	97.03	90.67
	Флакон 2							91.33
pH 7.0	Флакон 1	4.0259	4.0095	100.24	99.59	3.5649	89.12	88.91
	Флакон 2							89.92

¹В процентах от теоретического значения 4 мг/мл

²В процентах от результата после фильтрации

5.3.3. Чистота/сопутствующие субстанции.

Таблица 1-39

Чистота/сопутствующие субстанции, гистидин-HCl, pH 6,0

RRT	Количество (% площади/площадь)		
	До фильтрации	После фильтрации	Гистидин HCl, pH 6,0
	0.96	0.29	0.25
BT5528	98.50	98.57	98.47
1.12	0.75	0.80	0.69
1.16	0.12	<LOQ	0.12
1.33	0.11	0.13	0.10
Всего ¹	1.27	1.18	1.24

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

Таблица 1-40

Чистота/сопутствующие субстанции, гистидин-HCl, pH 6,5

RRT	Количество (% площади/площадь)		
	До фильтрации	После фильтрации	Гистидин HCl, pH 6,5
	0.96	0.22	0.17
BT5528	99.66	98.80	98.24
1.10	ND	0.44	0.48
1.12	0.76	0.44	0.58
1.29	0.10	<LOQ	0.12
1.33	<LOQ	<LOQ	0.10
Всего ¹	1.08	1.05	1.56

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

Таблица 1-41

Чистота/сопутствующие субстанции, гистидин-HCl, pH 7,0

RRT	Количество (% площади/площадь)		
	До фильтрации	После фильтрации	Гистидин HCl, pH 7,0
	0.94	<LOQ	ND
0.96	0.30	0.29	0.34
BT5528	98.37	98.41	98.62
1.10	0.45	0.52	ND
1.12	0.65	0.56	0.69
1.33	<LOQ	0.15	0.12
Всего ¹	1.40	1.52	1.26

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

5.3.4. Обсуждение и заключение.

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы трех составов оказался сходным, что свидетельствовало об отсутствии влияния pH или процесса приготовления продукта на внешний вид продукта. Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы оказался таким же, как и при осуществлении пробной лиофилизации и первого и второго циклов оптимизации.

Время восстановления спрессованной массы возрастало с увеличением значения pH от 3 мин и 4 с для pH 6 до 8 мин 38 с для pH 7,0. Это свидетельствует о том, что pH восстановленного раствора влияло на время восстановления. Кроме того, измененный процесс приготовления (уменьшение применения гидроксида натрия), по-видимому, приводил к улучшению времени восстановления до <9 мин для трех составов по сравнению со временем восстановления, составлявшим >11 мин для полученных ранее продуктов. Однако для достижения восстановления все еще требовалось вихревое перемешивание, и на поверхности флакона были обнаружены маслянистые капли. Таким образом, значение pH и присутствие соли не являются единственными факторами, участвующими в адсорбции API на поверхности флаконов.

Чистота/сопутствующие субстанции для трех составов оказались сходными (табл. 1-39 - табл. 1-41). Данные анализа продемонстрировали отсутствие связанных с адсорбцией потерь BT5528 во время фильтрации. Результаты анализа, свидетельствующие о более высоком содержании действующего вещества

(содержимое флакона) при pH 6 по сравнению с pH 7, демонстрируют, что более низкое значение pH до лиофилизации повышает уровень извлечения VT5528.

Маслянистые капли все еще были обнаружены, несмотря на более короткое время восстановления и повышенный уровень извлечения при pH 6 по сравнению с pH 7, и поэтому осуществляли дополнительное исследование для оценки альтернативных Сахаров и более низкой температуры вторичной сушки для увеличения содержания влаги в конечном продукте. Известно, что VT5528 обладает хорошей растворимостью в воде, и было выдвинуто предположение, что длительное время восстановления и образование маслянистых капель могут являться результатом пересушивания пептида в процессе лиофилизации. Это могло приводить к утрате гидратационной оболочки и изменению конформации пептида в лиофилизированном продукте.

6. Скрининг содержащих сахара составов.

Изменение pH состава до лиофилизации не предотвращало образование маслянистых капель на поверхности флаконов в процессе восстановления, но улучшало время восстановления (при pH 6 оно было короче, чем при pH 7).

Из-за особенностей адсорбции составов, лиофилизированных с использованием третьего цикла оптимизации, осуществляли оценку 5 составов с разными сахарами и альтернативным поверхностно-активным веществом. Состав композиций представлен в табл. 1-42.

Как уже обсуждалось в разделе 5.3.4, была высказана гипотеза о том, что продукт, возможно, был пересушен, что приводило к удалению гидратационной оболочки пептида, поэтому изучали также применение более короткой (при 0°C) продолжительности вторичной сушки помимо скрининга сахаров/поверхностно-активных веществ.

Таблица 1-42

Композиция продукта, представляющего собой лекарственное средство
(номер партии и подробное описание состава)

Состав 1	4 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл
Состав 2	4 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-80 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 10 мл
Состав 3	4 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл трегалозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 10 мл
Состав 4	4 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл декстрозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 10 мл
Состав 5	2 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина-HCL, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 10,6 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл

6.1. Приготовление раствора.

Каждый из составов приготавливали одинаковым образом, за исключением состава 5, подробное описание приготовления которого приведено отдельно. Добавляли примерно 35 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой ~ 262 мг гистидина и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали ~3 г сахарозы/трегалозы/декстрозы (составы 1-2, 3 и 4 соответственно) и добавляли с отмывкой, затем перемешивали до растворения. С помощью пипетки добавляли 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата-20 в раствор гистидина/сахарозы при приготовлении составов 1, 3 и 4 и 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата-80 при приготовлении состава 2. Растворы перемешивали вплоть до полного растворения. Измеряли pH каждого раствора.

Состав 5 приготавливали следующим образом: добавляли примерно 70 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой 524,9 мг гистидина и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 6,0031 г сахарозы и добавляли с отмывкой, затем перемешивали до растворения. С помощью пипетки добавляли 2 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата -20 в раствор гистидина/сахарозы и перемешивали вплоть до полного растворения. Измеряли pH раствора.

Для приготовления каждого из пяти составов отвешивали ~ 257 мг VT5528 и медленно добавляли, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Следует отметить, что во время добавления/растворения VT5528 прилипал к стенкам стаканов и имел гелеобразный внешний вид. VT5528 удаляли со стенок стакана с помощью пипетки, что приводило к полному растворению API в растворе. Измеряли pH растворов и доводили до pH 6,5 с помощью 1M гидроксида натрия, после чего переносили в 50-миллилитровую (составы 1-4) или 100-миллилитровую (состав 5) мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Растворы возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

Каждый из растворов фильтровали через один шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

Таблица 1-43

Значение pH раствора (номер партии, pH буфера и конечное pH)

Состав 1	7,74	6,51
Состав 2	7,75	6,52
Состав 3	7,65	6,52
Состав 4	7,76	6,51
Состав 5	7,75	6,52

6.2. Лиофилизация.

Данные об объеме заполнения растворами и типе флаконов представлены в табл. 1-44.

Таблица 1-44

Тип флакона и объем заполнения (номер партии, флакон (мл) и объем заполнения (мл))

Состав 1	20	5,3
Состав 2	10	5,3
Состав 3	10	5,3
Состав 4	10	5,3
Состав 5	20	10,6

Таблица 1-45

Параметры цикла лиофилизации

Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-25	100	75	0,20
7	Первичная сушка	-25	100	6450	N/A
8	Изменение температуры	0	20	125	0,20
9	Вторичная сушка	0	20	1009	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого)азота			
Общая продолжительность цикла ~135 ч (~5,6 дня)					

Лиофилизованная спрессованная масса состава 1 имела белый цвет, была хорошо сформированной и однородной без признаков усадки или коллапса. Лиофилизованная спрессованная масса составов 2, 4 и 5 имела белый цвет, была однородной, но имела признаки усадки.

У состава 3 (с трегалозой) обнаружен общий коллапс и возврат спрессованной массы в расплавленное состояние.

Тепловые характеристики составов, включающих трегалозу и декстрозу, не определяли перед лиофилизацией растворов, однако применяли консервативные параметры цикла. Из литературы известно, что температура коллапса трегалозы составляла примерно -28°C , т.е. выше известной и для сахарозы (-31°C), и для декстрозы (-41°C), и поэтому можно ожидать, что температура на полке при первичной сушке, составляющая -25°C , должна являться приемлемой. Данные, полученные при исследовании продукта, продемонстрировали, что температура продукта должна составлять приблизительно -38°C на начальных стадиях первичной сушки, и поэтому не ожидался коллапс продукта.

Для состава 4, содержащего декстрозу, коллапс не был обнаружен, и, таким образом, оказалось невозможным определить причину возможного коллапса.

6.3. Результаты.

6.3.1. Внешний вид раствора, pH и время восстановления.

Таблица 1-46

Внешний вид раствора, pH и время восстановления

Образец	Внешний вид ¹	pH	Время восстановления (мин)
Состав 1, 4 мг/мл	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках видны следы адсорбции	6,4	1 мин 35 с
Состав 1, 2 мг/мл	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена адсорбция	6,5	3 мин 17 с
Состав 1, 1,3 мг/мл	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена адсорбция	6,5	7 мин 27 с
Состав 2	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена адсорбция	6,5	5 мин 40 с
Состав 3	Прозрачный бесцветный раствор, лепешка не растворялась	6,5	16 мин 00 с
Состав 4	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках видны следы адсорбции	6,5	6 мин 40 с
Состав 5	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена слабая адсорбция ²	6,5	4 мин 03 с

Анализ в процессе цикла оптимизации продемонстрировал наличие адсорбции во всех составах. Составы 1-4 обладали значительными адсорбционными свойствами, при этом продукт, представляющий собой лекарственное средство, адсорбировался на стеклянном флаконе над восстановленным раствором и в нем. Наилучший результат получен для состава 5 (2 мг/мл ВТ5528), для которого обнаружено лишь небольшая адсорбция продукта, представляющего собой лекарственное средство, над раствором и отсутствие адсорбции внутри раствора. Вариабельность времени восстановления зависела от аналитической процедуры, отличающейся на протяжении всего испытания состава 1. Это было связано с сильными адсорбционными свойствами состава 1. Для раствора с концентрацией 4 мг/мл перемешивание раствора осуществляли сразу после добавления восстанавливающей среды, создавая сильное адсорбционное распределение над раствором. Период отстаивания перед перемешиванием, который применяли для раствора с концентрацией 2 мг/мл, обеспечивал лучшие характеристики восстановления, хотя адсорбция все еще имела место. Для раствора с концентрацией 1,3 мг/мл использовали период отстаивания, составляющий 5 мин, для того, чтобы минимизировать требуемое перемешивание. Адсорбция не улучшалась при таком увеличенном периоде отстаивания. Для состава 2 и остальных изученных составов период отстаивания составлял 2 мин, перемешивания 1 мин и заключительный период отстаивания 1 мин до перемешивания, выполняемого вплоть до растворения. Для состава 5 установлены наилучшие результаты по сравнению со всеми составами, и для четвертого цикла оптимизации для этого состава предложено применять обычный метод восстановления (перемешивание сразу после добавления восстанавливающей среды).

Таблица 1-47

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы

Образец	Внешний вид ¹
Состав 1	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета
Состав 2	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с видимыми признаками усадки
Состав 3	Белый диск в центре флакона с видимыми признаками общего коллапса
Состав 4	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с видимыми признаками усадки
Состав 5	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с видимыми признаками усадки

¹Ссылка на фотографии лиофилизированной лепешки, представленные в приложениях

6.3.2. Субвидимые частицы.

Таблица 1-48

Субвидимые частицы

Образец	10 мкм (количество/флакон)	25 мкм (количество/флакон)	Соответствует / не соответствует
Состав 1 ¹	855	71	Соответствует
Состав 2 ¹	3127	473	Соответствует
Состав 3 ¹	1866	46	Соответствует
Состав 4 ¹	5752	1304	Соответствует
Состав 5 ²	3074	21	Соответствует

¹При объеме заполнения 5,3 мл

²При объеме заполнения 10,6 мл

Следует отметить, что флаконы не автоклавировали/депирогенировали, это может приводить к завышенным значениям количества твердых частиц.

Результаты для частиц диаметром 10 мкм оказались завышенными для всех составов, для составов 2 и 4 это обусловлено адсорбцией, происходящей при восстановлении. Это в сочетании с применяемыми для оптимизации лиофилизации флаконами, которые не подвергали той же процедуре очистки, что и флаконы из технической партии, привело к завышенным результатам. Все результаты соответствовали фармакопейным спецификациям (<6000 частиц с диаметром 10 мкм на контейнер и <600 частиц с диаметром 25 мкм на контейнер), за исключением состава 4, который не соответствовал по уровню частиц с диаметром 25 мкм. Это может быть связано с низкой эффективностью восстановления и обнаруженными особенностями адсорбции.

3.3.3. Содержание воды.

Таблица 1-49

Содержание воды

Образец	Среднее содержание воды (мас.%)
Состав 1	2,60
Состав 2	2,87
Состав 3	11,08
Состав 4	1,69
Состав 5	3,84

Все полученные составы содержали оптимальные уровни воды <5% за исключением состава 3, в котором уровень был завышен. Для состава 3 требовалось интенсивное перемешивание и обработки ультразвуком из-за слабого растворения в безводном метаноле. Слабое растворение и усиленное перемешивание и обработка ультразвуком, необходимые для этой партии, свидетельствуют о том, что для этого состава существует проблема, связанная с содержанием влаги, и это подтверждается завышенным результатом по сравнению с другими составами.

6.3.4. Анализ и результаты, касающиеся чистоты.

6.3.4.1. До и после фильтрации.

Образцы фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм. Никаких проблем не возникало во время процесса фильтрации перед анализом с помощью детектора с переменной длиной волны (VWD).

Таблица 1-50

До и после фильтрации

Образец	До фильтрации [BT5528] (мг/мл)	После фильтрации [BT5528] (%)	% извлечения ¹
Состав 1	3,92	3,94	100,5
Состав 2	3,71	3,76	101,5
Состав 3	3,70	3,54	95,8
Состав 4	3,66	3,82	104,4
Состав 5	1,96	2,02	103,5

¹% извлечения относительно результата до фильтрации

Таблица 1-51

Чистота/сопутствующие субстанции до фильтрации

RRT	Состав и количество (площадь, %)				
	1	2	3	4	5
BT5528	98,41	99,01	99,25	99,25	99,20
1,10	1,51	0,98	0,26	0,75	0,72
1,11	N.D.	N.D.	0,49	N.D.	N.D.
Всего ¹	1,5	1,0	0,8	0,8	0,7

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

Таблица 1-52

Чистота/сопутствующие субстанции после фильтрации

RRT	Состав и количество (площадь, %)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99,24	99,38	99,11	99,13	99,30
1,10	0,76	0,52	0,89	0,87	0,63
Всего ¹	0,8	0,5	0,9	0,9	0,6

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

Для состава 3 уровень извлечения был ниже и не соответствовал тенденции, что, с учетом проблемы, связанной с влажностью и процедурой восстановления, подтверждает плохие характеристики этого состава по сравнению с другими составами. Трегалоза присутствовала только в указанном составе, это свидетельствует о том, что этот сахар является основной причиной низких показателей извлечения и несоответствия данным характеризующим основную тенденцию.

6.3.4.2. Содержимое флакона.

Таблица 1-53

Лиофилизированное содержимое флакона

Образец	Флакон 1 [BT5528] (мг/флакон)	Флакон 2 [BT5528] (мг/флакон)	Среднее содержание [BT5528] (мг/флакон)	% извлечения ¹
Состав 1	21,30	21,38	21,34	100,7
Состав 2	20,16	20,19	20,17	95,1
Состав 3	19,71	19,68	19,70	92,9
Состав 4	20,31	20,34	20,33	95,9
Состав 5	21,07	21,39	21,23	100,1

¹% извлечения относительно теоретического содержания BT5528, составляющего 21,2 мг/флакон

Данные о среднем содержании сопутствующих субстанций представлены в табл. 1-54.

Таблица 1-54

Чистота/сопутствующие субстанции

RRT	Состав и количество (площадь, %)				
	1	2	3	4	5
BT5528	99,30	99,13	99,24	99,30	99,22
1,10	0,70	0,87	0,76	0,70	0,79
Всего ¹	0,7	0,9	0,8	0,7	0,8

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

6.3.4.3. Чистота/сопутствующие субстанции.

Состав 1 восстанавливали с использованием трех различных объемов WFI (5,3 мл, 10,6 мл и 15,9 мл) с получением концентраций 4 мг/мл, 2 мг/мл и 1,3 мг/мл соответственно. Составы 2, 3 и 4 восстанавливали с использованием 5,3 мл WFI с получением концентрации 4 мг/мл, а состав 5 восстанавливали с использованием 10,6 мл WFI с получением концентрации 2 мг/мл. Осуществляли анализ действующего вещества и чистоты и сравнивали с теоретическим значением.

Таблица 1-55

Восстановленное содержимое флакона

Образец	Анализ (мг/мл)	Извлечения/теория ¹ %
Состав 1 (объем для восст. 5,3 мл)	3,52	88,1
Состав 1 (объем для восст. 10,6 мл)	1,02	50,9
Состав 1 (объем для восст. 15,9 мл)	1,32	99,2
Состав 2	3,55	88,8
Состав 3	2,51	62,8
Состав 4	3,42	85,5
Состав 5	2,06	103,0

¹% извлечения относительно теоретического содержания BT5528, составляющего 4 мг/мл, 2 мг/мл и 1,33 мг/мл

Таблица 1-56

Чистота/сопутствующие субстанции в составе 1 - три объема для восстановления

RRT	Объем для восстановления и количество (% площади)		
	5,3 мл	10,6 мл	15,9 мл
0,98	0,12	<LOQ	<LOQ
BT5528	99,08	98,69	98,95
1,10	0,32	0,54	0,25
1,11	0,44	0,21	0,26
1,12	<LOQ	0,53	0,58
Всего ¹	0,9	1,3	1,1

Таблица 1-57

Чистота/сопутствующие субстанции в составах 2-5 - три объема для восстановления

RRT	Объем для восстановления и количество (% площади)			
	2	3	4	5
0,98	N.D.	<LOQ	<LOQ	0,24
BT5528	98,74	98,80	98,38	98,69
1,10	0,46	0,50	0,52	0,26
1,11	0,58	0,59	0,66	0,33
1,12	0,41	<LOQ	0,41	0,53
Всего ¹	1,5	1,1	1,6	1,4

Результаты анализа, полученные для составов 1-5, варьировались, что являлось ожидаемым, учитывая исходные данные о восстановлении, это позволяет сделать заключение о том, BT5528 обладает способностью адсорбироваться на стеклянном флаконе. Состав 1 (1,3 мг/мл) и состав 5 обеспечивали наибо-

лее оптимальный процент извлечения (99,2% и 103,0%) соответственно. Другие данные о % извлечения связаны с потерей лекарственного продукта (API) в процессе восстановления. Частицы адсорбировались на стеклянном флаконе и не могли быть полностью растворены при дальнейшем перемешивании и выдерживании в течение примерно 1 ч. Период выдерживания, составляющий 1 ч, рассматривался как нереалистичный, и в четвертом цикле оптимизации период выдерживания должен быть сокращен (~ 5 мин), для облегчения восстановления.

6.4. Обсуждение и заключение.

Установлено, что все составы обладали способностью к адсорбции, и поэтому изменчивость и потеря продукта обнаружены на протяжении всего аналитического тестирования в третьем цикле оптимизации. Для состава 5 установлены лучшие результаты по сравнению с остальными четырьмя изученными составами. Концентрация API (2 мг/мл) в составе 5 была ниже по сравнению с другими составами (4 мг/мл). В четвертом цикле оптимизации рекомендовано изучение более низкой концентрации API. Это могло бы позволять дополнительно оценить эффективность восстановления и обеспечивать согласованный процесс перехода к технической партии. Также важно, чтобы процент извлечения при анализе постоянно находился на заданном уровне до изготовления технической партии.

7. Четвертый цикл лиофилизации.

Из-за особенностей адсорбции составов в процессе лиофилизации оценивали дополнительные составы. С учетом данных, полученных в процессе скрининга содержащих сахара составов, составы 1-5 повторно анализировали в сочетании с дополнительным составом, см. табл. 1-58. В процессе скрининга содержащих сахара составов изучали более низкую (0°C) температуру вторичной сушки для исследования потенциального пересыхания пептида и потери гидратационной оболочки. При осуществлении четвертого цикла оптимизации лиофилизации осуществляли возврат к применяемой ранее температуре вторичной сушки, равной 25°C, поскольку осуществление сушки при 0°C не улучшало характеристики восстановления.

Данные, полученные в процессе скрининга содержащих сахара составов, продемонстрировали улучшенный профиль восстановления при более низкой концентрации VT5528, составлявшей 2 мг/мл. Из-за снижения абсорбции, установленной для этого варианта, состав 5 оставляли для изучения в четвертом цикле оптимизации, в который вводили состав 6 с более низкой концентрацией полисорбата -20 для сохранения такого же соотношения между полисорбатом и API VT5528, что и в исходном основном составе (состав 1). Составы композиций представлены в табл. 1-58.

Таблица 1-58

Композиция продукта, представляющего собой лекарственное средство
(номер партии и подробное описание состава)

Состав 1	4 мг/мл VT5528, 5,25 мг/мл гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 5,3 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл
Состав 5	2 мг/мл VT5528, 5,25 мг/мл гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 10,6 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл
Состав 6	2 мг/мл VT5528, 5,24 мг/мл гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 10,6 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл

7.1. Приготовление раствора.

Каждый из составов приготавливали одинаковым образом. Добавляли примерно 35 мл или 70 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой 261,9 мг гистидина для состава 1 (50 мл), 524,9 мг для состава 5 и 524,7 мг для состава 6 (100 мл) и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения добавляли 3,0011 г сахарозы в состав 1, 6,0010 г в состав 5 и 6,0064 г в состав 6, затем перемешивали до растворения. С помощью пипетки добавляли 1 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата -20 в раствор гистидина/сахарозы для состава 1 и состава 6 и 2 мл для состава 5. Растворы перемешивали вплоть до полного растворения. Измеряли pH каждого раствора.

Для приготовления каждого из трех составов отвешивали ~ 257 мг VT5528 и медленно добавляли, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Следует отметить, что во время добавления/растворения состава 1 VT5528 прилипал к стенкам стакана, что было менее заметно для составов 5 и 6 (4 мг/мл по сравнению с 2 мг/мл). API удаляли со стенок стакана с помощью пипетки, что приводило к полному растворению API в растворе. Измеряли pH растворов и доводили до pH 6,5 с помощью 1M гидроксида натрия, после чего переносили в 50-миллилитровую (состав 1) или 100-миллилитровую (составы 5 и 6) мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Растворы возвращали в исходные стаканы и перемешивали с получением смеси.

Каждый из растворов фильтровали через один шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм, фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор без видимых частиц.

7.2. Лиофилизация.

Полученные растворы вносили в 20-миллилитровые прозрачные стеклянные флаконы типа I, используя объем заполнения 5,3 мл (состав 1) или 10,6 мл (состав 5 и состав 6), неплотно закупоривали с помощью 20-миллиметровых пробок, применяемых при сублимационной сушки, и лиофилизировали

непосредственно на полке, используя цикл, описанный в табл. 1-59.

Один флакон каждого из составов, расположенный в центре лотка, отбирали для мониторинга температуры продукта на протяжении всего цикла. Ход цикла контролировали на основе температуры (датчик полки/продукта) и перепадов давления в камере (емкостный манометр/манометр Пирани) для определения конечной точки первичной и вторичной сушки.

Таблица 1-59

Четвертый цикл оптимизации лиофилизации

Стадия	Стадия цикла	Температура (°C)	Давление (мТорр)	Время (мин)	Скорость изменения температуры (°C/мин)
1	Загрузка	5	N/A	N/A	N/A
2	Выдерживание	5	N/A	30	N/A
3	Изменение температуры	-40	N/A	180	0,25
4	Замораживание	-40	N/A	180	N/A
5	Дополнительное замораживание	-40	100	30	N/A
6	Изменение температуры	-25	100	75	0,20
7	Первичная сушка	-25	100	6386	N/A
8	Изменение температуры	25	20	250	0,20
9	Вторичная сушка	25	20	1102	N/A
10	Завершение	Флаконы запечатывали при 722,00 мТорр в атмосфере (чистого) азота			
Общая продолжительность цикла ~137 ч (~5,7 дня)					

7.3. Результаты.

7.3.1. Внешний вид раствора, pH и время восстановления.

Таблица 1-60

Внешний вид раствора, pH и время восстановления

Образец	Внешний вид ¹	pH	Время восстановления (мин)
Состав 1	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена умеренная адсорбция	6,6	1 мин 52 с
Состав 5	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена слабая адсорбция ²	6,6	39 с
Состав 6	Прозрачный бесцветный раствор, на боковых стенках обнаружена слабая адсорбция ²	6,6	40 с

¹Во всех составах присутствовали видимые частицы. См. фотографии восстановленного раствора, представленные на фиг. 32.

Как описано ранее, наибольшие трудности возникали с восстановлением состава 1, содержащего 4 мг/мл VT5528. Составы 5 и 6 было проще восстанавливать из-за более низкой концентрации VT5528. Для состава 1 характерна более высокая степень адсорбции, чем для составов 5 и 6, это подтверждает, что снижение концентрации VT5528 до 2 мг/мл обеспечивало лучшее восстановление и, поэтому меньшую степень адсорбции, при этом происходила адсорбция только очень мелких частиц.

Таблица 1-61

Внешний вид лиофилизированной спрессованной массы

Образец	Внешний вид
Состав 1	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой
Состав 5	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой
Состав 6	Гомогенная лиофилизированная лепешка белого цвета с заметной усадкой

7.3.2. Субвидимые частицы.

Таблица 1-62

Субвидимые частицы

Образец	10 мкм (количество/флакон) ¹	25 мкм (количество/флакон)	Соответствует/не соответствует ³
Состав 1 ¹	191	18	Соответствует
Состав 5 ²	445	92	Соответствует
Состав 6 ²	247	35	Соответствует

¹При объеме заполнения 5,3 мл

²При объеме заполнения 10,6 мл

³Количество частиц с диаметром ≥ 10 мкм на флакон ≤ 6000 обозначают понятием «соответствует» и количество частиц с диаметром ≥ 25 мкм на флакон ≤ 600 обозначают понятием «соответствует»

Результаты для частиц диаметром 10 мкм оказались слегка завышенными для всех составов. Флаконы, применяемые для оптимизации лиофилизации, не подвергали той же процедуре очистки, что и флаконы серии tech, и это могло приводить к завышенным результатам.

Все результаты соответствовали фармакопейным спецификациям (частиц с диаметром ≥ 10 мкм на флакон ≤ 6000 и количество частиц с диаметром ≥ 25 мкм на флакон ≤ 600).

7.3.3. Содержание воды.

Содержание влаги в лиофилизированной спрессованной массе определяли с помощью анализа Карла Фишера с использованием метанола в качестве растворителя. Для каждой партии анализировали отдельные образцы из дубликатов флаконов, см. табл. 1-63. При добавлении безводного метанола не обнаружено никаких проблем с восстановлением.

Таблица 1-63

Содержание воды

Образец	Среднее содержание воды (мас.%)
Состав 1	0,71
Состав 5	1,51
Состав 6	1,47

Все полученные составы содержали оптимальные уровни воды $< 5\%$. При добавлении безводного метанола не обнаружено никаких проблем с восстановлением.

7.3.4. Анализ и результаты, касающиеся чистоты

7.3.4.1. До и после фильтрации

Образцы фильтровали через шприцевой фильтр с PES-мембраной с размером пор 0,22 мкм. Никаких проблем не возникало во время процесса фильтрации. По ошибке образцы после фильтрации не были собраны до лиофилизации, поэтому результаты представлены относительно теоретической концентрации.

Таблица 1-64

До и после фильтрации

Образец	До фильтрации [BT5528] (мг/мл)	% извлечения ¹
Состав 1	3,64	91,0
Состав 5	1,97	98,5
Состав 6	1,91	95,5

¹% извлечения относительно теоретической концентрации, составляющей 4 мг/мл для состава 1 и 2 мг/мл для составов 5 и 6

Таблица 1-65

Чистота/сопутствующие субстанции до фильтрации

RRT	Состав и количество (площадь, %)		
	1	5	6
0.51	0.22	0.18	0.22
0.53	0.22	0.21	0.27
0.97	0.13	0.13	0.11
BT5528	98.35	98.63	98.61
1.10	0.55	0.61	0.51
1.30	0.11	0.11	0.14
Всего ¹	1.5	1.2	1.3

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

Для составов 5 и 6 извлечение превышало 95%, относительно теоретической концентрации 2 мг/мл. Уровень извлечения для состава 1 оказался существенно ниже и составлял 91%, что позволяет предположить, что применение действующего вещества в концентрации 2 мг/мл является более надежным.

Данные о сопутствующих веществах согласуются для всех трех составов.

7.3.5. Содержимое флаконов.

Таблица 1-66

Лиофилизированное содержимое флакона				
Образец	Флакон 1 [BT5528] (мг/флакон)	Флакон 2 [BT5528] (мг/флакон)	Среднее содержание [BT5528] (флакон)	% извлечения ¹
Состав 1	19,75	19,65	19,70	92,9
Состав 5	21,53	21,74	21,63	102,0
Состав 6	21,11	20,92	21,01	99,1

¹% извлечения относительно теоретического содержания BT5528, составляющего 21,2 мг/флакон

Данные о среднем содержании сопутствующих субстанций представлены в табл. 1-67.

Таблица 1-67

RRT	Чистота/сопутствующие субстанции		
	Состав и количество (площадь, %)		
	1	5	6
0.51	0.19	0.18	0.17
0.53	0.26	0.24	0.23
0.97	0.15	0.15	0.14
BT5528	98.34	98.26	98.44
1.10	0.70	0.79	0.65
1.30	0.10	0.11	0.12
Всего ¹	1.4	1.5	1.3

¹Сумма сопутствующих субстанций $\geq 0,10\%$

7.3.6. Восстановленный раствор

Состав 1 восстанавливали с использованием 5,3 мл WFI с получением концентрации 4 мг/мл. Составы 5 и 6 восстанавливали с использованием 10,6 мл WFI до концентрации 2 мг/мл. Осуществляли анализ (действующего вещества) и оценивали чистоту и сравнивали с теоретическим значением.

Таблица 1-68

Восстановленное содержимое флакона				
Образец	Флакон 1 [BT5528] (мг/мл)	Флакон 2 [BT5528] (мг/мл)	Среднее содержание [BT5528] (мг/мл)	% извлечения ¹
Состав 1	2,98	3,25	3,11	77,8
Состав 5	1,84	1,88	1,86	93,0
Состав 6	1,79	1,84	1,81	90,5

¹% извлечения относительно теоретической концентрации BT5528, составляющей 4 мг/мл и 2 мг/мл

Данные о среднем содержании сопутствующих субстанций представлены в табл. 1-69.

Таблица 1-69

RRT	Чистота/сопутствующие субстанции составов 1,5 и 6		
	Состав и количество (площадь, %)		
	1	5	6
0.51	0.28	0.23	0.20
0.53	0.31	0.29	0.27
0.97	0.15	0.14	0.12
BT5528	98.42	98.58	98.53
1.10	0.58	0.53	0.48
1.30	0.12	0.11	0.15
Всего ¹	1.4	1.3	1.2

Данные о сопутствующих веществах согласуются для всех трех составов. Представленные в табл. 1-69 результаты анализов свидетельствуют о более низких значениях относительно заданных для всех трех составов. Наихудший показатель установлен для состава 1, уровень извлечения для которого составлял примерно 78%. В составе 1 присутствовала самая высокая концентрация BT5528 (4 мг/мл) и поэтому его труднее всего было полностью восстанавливать из-за природы API BT5528. Результаты свидетельствуют о том, что концентрация BT5528 ниже 2 мг/мл является более благоприятной из изученных, и ее можно рассматривать для технической партии, не соответствующей требованиям GMP.

7.4. Заключение.

Внешний вид лиофилизата оказался сходным для всех трех изученных составов - он представлял собой белый гомогенный продукт с небольшой усадкой. Изменение концентрации BT5528 и больший объем заполнения не влияли на внешний вид продукта.

Время восстановления растворов с концентрацией 2 мг/мл (составы 5 и 6) оказалось на 1 мин быстрее по сравнению с раствором с концентрацией 4 мг/мл (состав 1). Не обнаружено различий во времени восстановления при использовании двух концентраций полисорбата-20, т.е. 0,1 и 0,2 мг/мл (составы 5 и 6 соответственно), что свидетельствует об отсутствии воздействия полисорбата-20 на время восстановле-

ния.

Содержание влаги в составе 1 было ниже, чем в составах 5 и 6, что является ожидаемым, поскольку объем заполнения составлял половину.

Не обнаружено различия в чистоте/сопутствующих субстанциях до и после лиофилизации или между тремя изученными составами. Однако обнаружено различие в проценте извлечения относительно теоретического значения. Анализируемое значение для состава 1 составляло 77,8% от теоретического (3,11 мг/мл) по сравнению с 91-93% для составов 5 и 6 (1,86 и 1,18 мг/мл), что свидетельствует об улучшенном восстановлении лиофилизованного продукта с более низкой концентрацией BT5528.

8. Оценка фильтрации

При производстве в соответствии требованиями GMP основной раствор должен быть стерилизован фильтрацией (размер пор 0,22 мкм). Должны быть изучены совместимость с фильтром и возможные потери материала в результате адсорбции на мембране и корпусе фильтра. Также должен быть осуществлен мониторинг сопутствующих субстанций.

Известный объем состава (табл. 1-71) пропускали с помощью перистальтического насоса и силиконовой трубки, отвержденной платиной, через запатентованную фильтрующую (фармацевтически) чистую капсулу "P" с известной площадью поверхности для оценки адсорбционных потерь на 1 см² площади поверхности фильтра на мембране одного типа; PES (полиэфирсульфон) (мини-капсульный фильтр Kleenpak, KA02EKVP2S, площадь поверхности 220 см²).

Оценивали легкость фильтрации, измеряемую как противодействие в восходящем потоке фильтра. Концентрацию действующего вещества и сопутствующих субстанций в растворе до фильтрации и в пяти последовательных ранних образцах фильтрата и в конечном объеме фильтрата определяли с помощью UPLC. Определяли также pH образцов до фильтрации и образцов фильтрата.

Адсорбция действующего вещества на фильтрующей мембране или поверхности капсулы, если это имеет место, обычно связана с явлением насыщения. После определения объема раствора, обеспечивающего насыщение фильтрующей капсулы определенного типа, он становится отбрасываемым начальным объемом для этой конкретной капсулы. Для лаборатории заявителя важно обеспечить меры, гарантирующие, что отношение отфильтрованного объема (мл) к общей поверхности фильтра (см²) составляло ≥ 5 .

Таблица 1-70

Состав композиции для оценки фильтрации (номер партии и подробное описание состава)

Оценка фильтрации	2 мг/мл BT5528, 5,24 мг/мл гистидина, 60 мг/мл сахарозы, 0,1 мг/мл полисорбата-20 (объем заполнения 10,6 мл - 21,2 мг/флакон), флакон 20 мл
-------------------	---

8.1. Приготовление раствора

Состав, подробно описанный в табл. 1-70, приготавливали в 200-миллилитровом масштабе. Добавляли примерно 140 мл WFI в стакан, содержащий стержень магнитной мешалки. В него добавляли с отмывкой ~1,05 г гистидина и перемешивали с помощью магнитной мешалки до растворения. После растворения отвешивали 12 г сахарозы и добавляли с отмывкой, затем перемешивали до растворения. С помощью пипетки добавляли 2 мл 1% (мас./об.) раствора полисорбата-20 в раствор гистидина/сахарозы и перемешивали вплоть до полного растворения.

Отвешивали ~514 мг BT5528 и медленно добавляли в раствор, затем перемешивали в течение 90 мин до полного растворения. Измеряли pH раствора и доводили до pH 6,5 с помощью 1M гидроксида натрия, после чего переносили в 200-миллилитровую мерную колбу и доводили до требуемого объема с помощью WFI. Растворы возвращали в исходный стакан и перемешивали с получением смеси.

8.2. Фильтрация.

Образец раствора предварительно фильтровали для анализа с помощью UPLC, а оставшуюся часть фильтровали через один капсульный фильтр PES, 0,22 мкм с использованием силиконовой трубки, отвержденной платиной, и перистальтического насоса.

В процессе фильтрации собирали следующие аликвоты:

до фильтрации

0-10 мл,

10-20 мл,

20-30 мл,

30-40 мл,

40-50 мл,

фильтрат основной части раствора.

Раствор легко фильтровался, а противодействие было низким, полученный в результате фильтрат представлял собой прозрачный бесцветный раствор, не содержащий видимых частиц.

Аликвоты анализировали с помощью UPLC, осуществляя определение действующего вещества и сопутствующих субстанций, для решения вопроса о том, была ли потеря действующего вещества на фильтрующей мембране, или для анализа экстрагируемых/выщелачиваемых веществ, указывающих на несовместимость с мембраной.

8.3. Результаты.

Таблица 1-71

Содержимое флаконов образцов для фильтрации

Образец	Анализ (мг/мл)	Извлечение/теор. ¹ (%)	Извлечение/до фильтрации ² (%)
До фильтрации	2.03	101.5	-
Первые несколько мл	1.77	88.5	87.2
10-20 мл	1.97	98.5	97.0
20-30 мл	1.98	99.0	97.5
30-40 мл	2.02	101.0	99.5
40-50 мл	2.06	103.0	101.5
Основная часть раствора	2.04	102.0	100.5

¹% извлечения относительно теоретической концентрации, составляющей 2 мг/мл ВТ5528

²% извлечения относительно результата до фильтрации

Таблица 1-72

Оценка чистоты/сопутствующих субстанций при фильтрации

RRT	Объем и количество (% площади)						
	До фильтрации	Первые несколько мл	10-20 мл	20-30 мл	30-40 мл	40-50 мл	Основная часть
0.51	0.18	0.21	0.19	0.18	0.18	0.19	0.18
0.53	0.22	0.26	0.21	0.23	0.20	0.21	0.21
0.96	0.14	0.11	0.12	0.13	0.13	0.15	0.14
0.97	0.56	0.65	0.60	0.59	0.61	0.59	0.55
ВТ5528	97.94	98.18	98.28	98.17	98.16	98.11	98.27
1.10	0.61	0.47	0.57	0.64	0.65	0.67	0.46
Всего ¹	1.8	1.7	1.7	1.8	1.8	1.8	1.5

В первых 0-10 мл образца, пропущенного через PES-фильтр, обнаружено снижение содержания действующего вещества. Это не является неожиданным и указывает на то, что для данного типа фильтров необходим небольшой отбрасываемый объем. Приемлемые уровни извлечения достигались после фильтрации 0-10 мл, и не обнаружено значительного изменения общего количества примесей. Таким образом, PES-фильтры являются пригодными для приготовления лекарственного продукта на основе ВТ5528.

8.4. Обсуждение и заключение.

Данные о фильтрации раствора через капсульный PES-фильтр с низким противодавлением, свидетельствуют о том, что данную мембрану можно применять для фильтрации этого раствора.

Не обнаружено изменения в чистоте/сопутствующих субстанциях в собранных аликвотах или в основном растворе, что указывает на отсутствие экстрагируемых/выщелачиваемых веществ.

Данные, полученные при анализе, свидетельствуют о начальном снижении концентрации ВТ5528 в первой собранной аликвоте (0-10 мл), в которой извлечение составляло 88,5% относительно теоретического, однако результаты анализа возвращались к заданному показателю после фильтрации 10-20 мл. Это указывает на то, что при изготовлении технической партии, не соответствующей требованиям GMP, следует использовать отбрасываемый объем 10 мл на фильтр.

9. Заключение.

В настоящем изобретении продемонстрирована успешная разработка стабильного лиофилизированного состава для последующего создания технической партии, не соответствующей требованиям GMP.

Осуществляли оптимизацию циклов лиофилизации, однако из-за проблем с адсорбцией ВТ5528 на поверхности флаконов и проблем с восстановлением для создания технической партии, не соответствующей требованиям GMP, предложен более консервативный цикл.

Была проведена оценка фильтрации, которая продемонстрировала первоначальное снижение концентрации ВТ5528 во время фильтрации, которое вернулось к заданному значению после фильтрации 10 мл. Для создания технической партии, не соответствующей требованиям GMP, предложено использовать отбрасываемый объем 10 мл на фильтр.

Причину адсорбции ВТ5528 на поверхности флаконов изучали при осуществлении отдельных циклов лиофилизации. В качестве возможных причин рассматривали ряд гипотез: высокая концентрация хлорида натрия в конечном продукте, более щелочное значение pH восстановленного продукта, силанизированные флаконы и пересушивание пептида. Каждую гипотезу оценивали в сочетании со скринингом составов, включающих альтернативные сахара, поверхностно-активные вещества и более низкую концентрацию ВТ5528, для того, чтобы выяснить, улучшало ли это характеристики восстановления. Улучшенное время восстановления получали при использовании более низкого pH перед лиофилизацией, однако маслянистые капли сохранялись на поверхности флакона.

Снижение содержания хлорида натрия, применение силанизированных флаконов и снижение температуры вторичной сушки (для увеличения конечного содержания влаги продукта) не улучшали характеристики восстановления. Применение альтернативных Сахаров или поверхностно-активных веществ

не приводило к улучшению, однако установлено, что снижение концентрации BT5528 с 4 мг/мл до 2 мг/мл улучшало характеристики восстановления. Время восстановления снижалось и никаких маслянистых капель не обнаружено на поверхности флаконов после восстановления. Извлечение относительно теоретического находилось на заданном уровне в составе с концентрацией 2 мг/мл по сравнению со стабильно более низким по сравнению с заданным показателем для составов с концентрацией 4 мг/мл.

На основе результатов исследований адсорбции BT5528 на поверхности и после обсуждения с заказчиком для создания технической партии, не соответствующей требованиям GMP, в качестве лидирующего состава был выбран состав с концентрацией BT5528 2 мг/мл.

Пример 2. Фаза I/II исследования безопасности, фармакокинетических характеристик и предварительной клинической активности BT5528 на пациентах с запущенными (распространенными) формами злокачественных новообразований, ассоциированных с экспрессией EphA2.

2.1 Цели.

Основные цели.

Основными целями исследования с эскалацией дозы (части A-1 и A-2) являлись:

оценка безопасности и переносимости BT5528 на пациентах с распространенными солидными злокачественными опухолями, ассоциированными с экспрессией EphA2, при применении в качестве монотерапии (часть A-1) и в комбинации с ниволумабом (часть A-2),

определение максимальной переносимой дозы (MTD) BT5528, если это возможно, и определение рекомендованной на фазе II дозы (RP2D) при применении в качестве монотерапии (часть A-1) и в комбинации с ниволумабом (часть A-2).

Основными целями расширений исследования (части B-1 и B-2) являлись:

оценка клинической активности BT5528 на пациентах, имеющих солидные опухоли с выбранными показаниями, при его применении в качестве монотерапии (часть B-1) и в комбинации с ниволумабом (часть B-2) на основе критериев RECIST 1.1.

Дополнительные (вторичные) цели.

Дополнительными целями эскалации дозы (части A-1 и A-2) в данном исследовании являлись:

оценка предварительных проявлений противоопухолевой активности, достигаемых при введении BT5528 у пациентов с распространенными солидными злокачественными опухолями, ассоциированными с экспрессией EphA2, при его применении в качестве монотерапии (часть A-1) и в комбинации с ниволумабом (часть A-2),

определение фармакокинетических (ФК) параметров BT5528,

определение частоты возникновения антител к лекарственному средству (ADA).

Дополнительными целями расширений исследования (части B-1 и B-2) являлись:

оценка безопасности и переносимости BT5528 на имеющих солидные опухоли пациентах с выбранными показаниями при применении в качестве монотерапии (часть B-1) и в комбинации с ниволумабом (часть B-2),

определение фармакокинетических (ФК) параметров BT5528,

определение частоты возникновения антител к лекарственному средству (ADA).

2.2. Дизайн исследования.

Настоящее исследование представляло собой фазу I/II проводимого впервые на людях открытого исследования с эскалацией дозы BT5528, при его применении в качестве единственного агента (Части A-1 и B-1) и в комбинации с ниволумабом (части A-2 и B-2). Настоящее исследование состояло из двух частей: часть A, эскалация дозы и часть B, расширение дозы.

2.3. Исследуемые лекарственные средства, дозы и формы введения BT5528 в возрастающих дозах вводили внутривенно посредством инфузии в течении 1 ч. Ниволумаб вводили согласно инструкции.

2.4. Критерии включения - все пациенты.

Для включения в исследование пациенты должны удовлетворять следующим критериям:

1. Наличие письменного информированного согласия в соответствии с местными руководящими требованиями, подписанного и датированного пациентом или законным опекуном до проведения любых специфичных для исследования процедур, взятия проб или анализов. Если пациент отказывается участвовать в каком-либо добровольном компоненте исследования (например, биопсия опухоли), то пациент не будет оштрафован или лишен выгоды, и он/она не будет исключен/исключена из других аспектов исследования.

2. Возраст должен составлять не менее 18 лет на момент подписания формы информированного согласия.

3. Общее состояние здоровья согласно шкале оценки Восточной кооперативной онкологической группы (ECOG) должно соответствовать баллу 0 или 1.

Шкала оценки общего состояния здоровья ECOG		Шкала Карновского оценки общего состояния здоровья	
Балл	Описание	Процент	Описание
0	Нормальная активность. Полностью активен, способен выполнять без ограничений всю работу, которую выполнял до заболевания	100	Нормальное состояние, жалобы отсутствуют, нет проявлений заболевания
		90	Способен осуществлять нормальную активность; слабые признаки или симптомы заболевания
1	Симптомы, не требующие нахождения в стационаре (амбулаторные). Ограничен в требующей физических усилий деятельности, но амбулаторно, и способен выполнять легкую или сидячую работу (например, легкая домашняя работа, офисная работа)	80	Нормальная активность с усилиями; некоторые признаки или симптомы заболевания
		70	Способен заботиться о себе, неспособен осуществлять нормальную активность или выполнять активную работу

4. Пациенты должны иметь поддающееся определению заболевание согласно критериям оценки ответа солидных опухолей (RECIST) v1.1.

5. Приемлемая функция органов, характеризующаяся следующими данными лабораторных анализов:

почечная функция: клиренс креатинина ≥ 50 мл/мин по уравнению Кокрофта-Голта или по результатам 24-часового сбора мочи;

общий билирубин $\leq 1,5 \times \text{ULN}$ (верхняя граница нормы);

сывороточный альбумин $\geq 2,5$ г/дл;

аспартатаминотрансфераза (AST) $\leq 2,5 \times \text{ULN}$ или $\leq 5 \times \text{ULN}$ при наличии метастазов в печени;

аланинаминотрансфераза (ALT) $\leq 2,5 \times \text{ULN}$ или $\leq 5 \times \text{ULN}$ при наличии метастазов в печени;

международное нормализованное отношение (INR) $< 1,3$ или \leq институциональной (ведомственной) ULN (антикоагулянты не разрешены).

6. Приемлемая гематологическая функция (пациенту не разрешено осуществлять трансфузию эритроцитов или тромбоцитов или вводить факторы роста в течение 4 недель после обработки первой дозой BT5528):

гемоглобин ≥ 9 г/дл;

абсолютное количество нейтрофилов (ANC) ≥ 1500 клеток/мм³; и

количество тромбоцитов ≥ 75000 клеток/мм³.

7. Отрицательный результат теста на беременность для женщин с детородным потенциалом (WOCBP) (отрицательный результат теста сыворотки при скрининге и отрицательный результат теста мочи или сыворотки в течение 3 дней до введения первой дозы BT5528). Пациентам мужского пола с партнершами женского пола с детородным потенциалом и пациенткам женского пола с детородным потенциалом необходимо соблюдать высокоэффективную контрацепцию (разрешены оральные и гормональные контрацептивы) по крайней мере столь же надежную, что и рекомендуемая Группой содействия клиническим испытаниям (CTFG) при частоте неудач менее 1%. (https://www.hma.eu/fileadmin/dateien/Human_Medicines/01-About_HMA/Working_Groups/CTFG/2014_09_HMA_CTFG_Contraception.pdf), во время их участия в исследовании и в течение 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства. Пациенты мужского пола также должны воздерживаться от сдачи спермы во время их участия в исследовании в течение 6 месяцев после введения последней дозы исследуемого лекарственного средства, а женщины не должны кормить грудью в течение этого времени или сдавать яйцеклетки.

Женщины, не обладающие детородным потенциалом, определяются следующим образом:

женщины считаются находящимися в постменопаузе и не способными к деторождению, если у них имела место естественная (спонтанная) аменорея в течение 12 месяцев с соответствующим клиническим профилем (например, соответствующий возраст, наличие вазомоторных симптомов в анамнезе),

женщины, подвергшиеся постоянной форме стерилизации (например, окклюзия маточных труб, гистерэктомия, двусторонняя сальпингэктомия, двусторонняя овариэктомия),

женщины в возрасте >45 лет, не использующие гормонозаместительную терапию и у которых наблюдалось полное прекращение менструаций в течение по крайней мере 12 месяцев ИЛИ имеющих уровень фолликулостимулирующего гормона (FSH) >40 мМЕ/мл и уровень эстрадиола <40 пг/мл (140 пмоль/л),

женщины в возрасте >45 лет, использующие гормонозаместительную терапию и у которых наблюдалось полное прекращение менструаций в течение по крайней мере 1 года ИЛИ у которых были документально подтвержденные признаки менопаузы, основанные на уровне FSH >40 мМЕ/мл и уровне эстрадиола <40 пг/мл до начала гормонозаместительной терапии.

8. Наличие архивных образцов опухоли в течение 9 месяцев до даты введения первой дозы BT5528 или готовность предоставить свежую биопсию опухоли во время скрининга.

9. Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 12 недель после начала лечения BT5528 в соответствии с

заклЮчением исследователя.

10. Наличие готовности и способности соблюдать протокол и процедуры исследования.

Дополнительные критерии включения - только для части А 1. Пациенты с запущенными формами гистологически подтвержденных злокачественных солидных опухолей, в отношении которых известно, что они характеризуются высокой экспрессией EphA2 (немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак желудка/верхних отделов желудочно-кишечного тракта (GI), рак поджелудочной железы и уротелиальный рак), с рецидивом после предыдущей терапии и которые являются кандидатами на участие в исследовании фазы I из-за отсутствия утвержденных или стандартных вариантов лечения. Пациенты с другими опухолями могут быть включены в исследование, если у них имеются доказательства высокой экспрессии EphA2 в опухолевой ткани, собранной в течение 9 месяцев до даты введения первой дозы BT5528. SRC (научно-исследовательский совет) может принять решение о необходимости включения определенных типов опухолей в число тех, которые перечислены в разделе 3.1.1, в любой момент при исследовании эскалации, если сочтет необходимым дополнить оценку биомаркеров, безопасности или ФК для конкретного типа опухоли.

Дополнительные критерии включения - части В-1 и В-2 - когорты с NSCLC, участвующие в монотерапии и комбинированной терапии.

1. Могут быть включены пациенты с метастатическим рецидивирующим заболеванием, гистологически подтвержденным как подтип аденокарциномы NSCLC (адено-NSCLC), для которых должны быть исчерпаны все стандартные варианты лечения, имеет место прогрессирование на фоне или после химиотерапии на основе платины, и/или лечение которых по меньшей мере с использованием одной предыдущей линии терапии оказалось неудачным, которые имеют признаки прогрессирования по данным радиологического исследования при использовании самой современной линии терапии. При характерных для опухолей геномных нарушениях EGFR, ALK, NTRK, ROS1 или других факторов они не должны быть кандидатами или должны получать надлежащее лечение заболевания, связанного с драйверными мутациями, если это может быть осуществлено. Если они ранее подвергались иммунотерапии, то последняя доза должна быть введена по меньшей мере за 28 дней до первой дозы BT5528.

2. По крайней мере 6 пациентов в когорте должны иметь по крайней мере 1 опухолевое поражение, поддающееся биопсии, и они должны быть готовы пройти биопсию до введения первой дозы BT5528 и после любой дозы в цикле 1.

2.5. Критерии исключения - все пациенты.

Пациенты, удовлетворяющие любому из перечисленных ниже критериев, должны быть исключены из участия в исследовании.

1. Химиотерапевтическое лечение в течение 14 дней до введения первой дозы исследуемого лекарственного средства, другие противораковые терапии в течение 28 дней или 5 периодов полувыведения, в зависимости от того, что короче. Обнаруженные ранее виды токсичности у пациента должны быть снижены до 1 степени в соответствии с Общепринятыми терминологическими критериями нежелательных явлений (CTCAE), v 5.0 (за исключением алопеции, которая должна не превышать 2 степень).

2. Экспериментальное лечение в течение 4 недель до введения первой дозы BT5528.

3. Текущее лечение сильными ингибиторами или индукторами CYP3A4 или сильными ингибиторами P-gp, в том числе на растительной или пищевой основе.

4. Известная чувствительность к любому из ингредиентов исследуемого продукта или к монотерапии лауростатину Е (ММАЕ).

5. Серьезное медицинское состояние, угрожающее жизни заболевание, активная неконтролируемая инфекция или дисфункция системы органов (например, асцит, коагулопатия, энцефалопатия), или другие причины, которые по мнению исследователя могут поставить под угрозу безопасность пациента или помешать или поставить под угрозу целостность результатов исследования, включая учет сопутствующих заболеваний желудочно-кишечного тракта, кожи и легких, а также обзор скрининговой компьютерной томографии грудной клетки, проводимый для того, чтобы убедиться в отсутствии клинически значимых сопутствующих заболеваний.

6. Серьезная операция (за исключением размещения сосудистого доступа) в течение 4 недель до введения первой дозы BT5528 и необходимость адекватного восстановления до начала исследуемого терапевтического лечения.

7. Получение живой вакцины в течение 30 дней до исследуемой обработки.

8. Неконтролируемые симптоматические метастазы в головной мозг (пациент должен иметь стабильный неврологический статус после местной терапии в течение по меньшей мере 4 недель без применения стероидов или принимать стабильную или пониженную дозу, которая была ниже или эквивалента суточной дозе 10 мг преднизона или его эквивалента, и у него должны отсутствовать неврологические дисфункции, которые могли бы затруднить оценку неврологических и других НЯ).

9. Пациенты с неконтролируемой гипертензией (систолическое кровяное давление [BP] ≥ 139 ММНг; диастолическое BP ≥ 89 ММНг) до введения первой дозы BT5528 (должны находиться под стабильным контролем не менее 3 месяцев).

10. История болезни или текущие данные о каком-либо состоянии, терапии или лабораторных отклонениях, которые могут повлиять на результаты исследования, помешать участию пациента или не отвечают наилучшим интересам пациента участвовать (в исследовании) по мнению исследователя, включая (но не ограничиваясь только ими):

наличие в анамнезе пациентов сосудистых заболеваний головного мозга (инсульт или транзиторная ишемическая атака), стенокардии, инфаркта миокарда, застойной сердечной недостаточности или симптомов III-IV класса согласно классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, задокументированных в течение 6 месяцев до введения первой дозы ВТ5528, или

i - средний скорректированный интервал QT в покое (QTcF) >470 мс,

ii - любые факторы, которые повышают риск удлинения интервала QT или риск нарушений ритма, такие как сердечная недостаточность, гипокалиемия, врожденный синдром удлинения интервала QT, семейный анамнез синдрома удлинения интервала QT или необъяснимой внезапной смерти в возрасте до 40 лет, или применение любых сопутствующих медикаментозных средств, для которых известно, что они удлиняют интервал QT;

iii - любые клинически значимые (по мнению исследователя) нарушения ритма, проводимости или морфологии электрокардиограмм в состоянии покоя (ЭКГ), например, полная блокада левой ножки пучка Гиса, блокада сердца третьей степени.

11. Установленное заражение вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или наличие синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД).

12. Положительная реакция на поверхностный антиген вируса гепатита В и/или антитело к ядерному антигену вируса гепатита В. Пациентам с отрицательным результатом анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) разрешается участвовать при проведении соответствующей противовирусной терапии.

13. Активная форма инфекционного гепатита С с положительной вирусной нагрузкой, если реакция на антитела к вирусу гепатита С (HCV) положительная (если реакция на антитела отрицательная, то тест на вирусную нагрузку не применим). Пациенты, проходившие лечение от инфекции, вызываемой вирусом гепатита С, могут быть включены, если у них имеется документальное подтверждение устойчивого вирусологического ответа продолжительностью ≥ 12 недель.

14. Тромбоэмболические осложнения и/или нарушения свертываемости крови в течение 3 месяцев (например, тромбоз глубоких вен [DVT] или тромбоз легочной артерии [PE]) до введения первой дозы ВТ5528.

15. Наличие в анамнезе другого злокачественного заболевания в течение 3 лет до введения первой дозы ВТ5528 или наличие любых остаточных признаков ранее диагностированного злокачественного новообразования (за исключением адекватно пролеченной с целью исцеления базально-клеточной карциномы, плоскоклеточного рака кожи, интраэпителиальной неоплазии шейки матки/рака шейки матки *in situ* или меланомы *in situ* или протоковой карциномы *in situ* молочной железы).

16. Системное противоионфекционное лечение или наличие лихорадки в течение последних 14 дней до введения первой дозы ВТ5528.

17. Психологические, семейные, социологические или географические условия, которые не позволяют выполнять требования протокола и/или последующие процедуры, описанные в протоколе.

Дополнительные критерии исключения - части А-2 и В-2, когорты для комбинированного лечения с применением ниволумаба

1. Установленная ранее непереносимость ингибитора иммунных контрольных точек.

2. Установленная гиперчувствительность к терапии, основанной на применении ингибитора контрольных точек.

3. Имевшая место ранее трансплантация органа (включая аллогенную).

4. Диагноз клинически значимого иммунодефицита.

5. Активная системная инфекция, требующая терапии.

6. Ежедневный прием более 10 мг эквивалента преднизона или другого сильного иммунодепрессанта.

7. Наличие в анамнезе аутоиммунного заболевания за исключением алопеции или витилиго.

8. Наличие в анамнезе интерстициального заболевания легких.

2.6 Корреляционное тестирование.

Все пациенты должны предоставить архивный материал опухоли или свежую биопсию опухоли для оценки уровней экспрессии EphA2 и дополнительной молекулярно-генетической характеристики (т.е. оценки специфических соматических мутаций и т.д.). Этот материал следует предоставить в виде блока ткани или 10-15 неокрашенных предметных стекол, залитых в парафин.

Для исследования внутриопухолевых ФК/фармакодинамических эффектов ВТ5528 должны быть взяты биопсии опухоли до и после введения дозы. Биопсия опухоли до и после введения дозы является необязательной для всех пациентов, но должна быть обязательной для подгруппы пациентов, участвующих в части В (6 на когорт). Биопсию после введения дозы в цикле 1 требуется осуществлять после любой дозы, поскольку она проводится в течение 4-36 ч после введения дозы ВТ5528. Более подробная ин-

формация представлена в графике оценок (SOA).

Также должны быть взяты образцы крови до и после введения дозы для оценки фармакодинамики, ответа и биомаркеров резистентности к лечению, таких как соматические мутации в циркулирующей опухолевой ДНК (ctДНК), ADA, и для фармакогеномного анализа.

2.7. Статистическая методология.

Эскалация дозы (применяется отдельно для А-1 и А-2): Фактическое количество уровней дозы, которые должны быть изучены в этом исследовании, должно зависеть от определения непереносимой дозы на основе ограничивающей дозу токсичности (DLT). MTD должна быть определена на основе DLT (см. раздел 5). Для определения RP2D (рекомендуемая доза фазы II), которая не должна превышать MTD, следует применять и другие данные о безопасности, а также профили ФК, наблюдаемые во время проведения исследования, и любые тенденции противоопухолевой активности.

Для первых двух уровней дозы должна использоваться схема 3+3. При каждом уровне дозы в исследовании должны участвовать по крайней мере 3 пациента, пригодных для оценки, и их следует оценивать в течение 28 дней перед повышением дозы до следующего уровня. После подтверждения переносимости на первом уровне дозы можно повышать дозу не более чем на 100% до второго уровня дозы. Циклы обработки должны выполняться последовательно в соответствии с SOA. Если у одного пациента обнаружена DLT, то еще 3 пациента должны получить ту же дозу. Перед переходом к следующему уровню дозы требуется оценка когорты, состоящей по меньшей мере из 3 пациентов, завершивших цикл 1 лечения (28 дней). Дополнительные сведения приведены в разделе 5.

После подтверждения переносимости первых двух уровней дозы все последующие увеличения интервала доз будут основываться на типе метода непрерывной переоценки (CRM) с использованием двухпараметрической байесовской модели логистической регрессии (BLRM) и принципа увеличения с контролем передозировки (EWOC), согласно которому следующий более высокий уровень увеличенной дозы должен иметь самую высокую апостериорную вероятность возникновения DLT в заданном интервале (20%, 33%) среди доз, удовлетворяющих критерию передозировки, состоящему в том, что существует $\leq 25\%$ вероятность того, что уровень дозы будет признан небезопасным (частота встречаемости DLT $\geq 33\%$). BLRM должна быть применена к совокупным данным DLT/безопасности, и результаты должны быть предоставлены SRC, и после рассмотрения этих данных SRC должен вынести рекомендацию относительно точного увеличения дозы. Расчетная схема увеличения дозы приведена в разделе 5, а полная информация приведена в Приложении F: Details and Operating Characteristics of the Dose Escalation Design (Подробное описание и рабочие характеристики схемы увеличения дозы).

Для каждой когорты, участвующей в Части В, должна использоваться 2-этапная схема Саймона, где $p_0 = 0,175$ и $p_1 = 0,35$ с односторонним альфа-критерием 0,05 и мощностью 80%, где p_0 и p_1 являются нулевой и альтернативной гипотезами для общей частоты ответов (ORR). Если у 3 или большего количества пациентов из числа первых 14 набранных пациентов выявлен объективный ответ ($ORR \geq 21\%$), то дозу следует ввести еще 26 пациентам; в противном случае исследование когорты должно быть прекращено.

Таким образом, максимальное число пациентов, включенных в исследование, составляет 152; 48 в Части А-1, 24 в Части А-2 и 40 в каждой из двух когорт Части В.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 BT5528 или его фармацевтически приемлемую соль;
 примерно 1,31-2,62 мг гидрохлорида гистидина на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
 примерно 15-30 мг сахарозы на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли; и
 примерно 0,05-0,1 мг полисорбата-20 на 1 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли.
2. Фармацевтическая композиция по п.1, которая представляет собой твердую фармацевтическую композицию в форме лиофилизированного порошка.
3. Фармацевтическая композиция по п.1, которая представляет собой жидкую фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую воду.
4. Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая:
 примерно 21,2 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
 примерно 55,5 мг гидрохлорида гистидина;
 примерно 636 мг сахарозы; и
 примерно 1,06-2,12 мг полисорбата-20.
5. Фармацевтическая композиция по п.1, содержащая:
 примерно 21,2 мг BT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
 примерно 27,8 мг гидрохлорида гистидина;
 примерно 318 мг сахарозы; и
 примерно 1,06 мг полисорбата-20.

6. Фармацевтическая композиция по п.3, содержащая:
примерно 2-4 мг/мл VT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
примерно 5,25 мг/мл гидрохлорида гистидина;
примерно 60 мг/мл сахарозы; и
примерно 0,1-0,2 мг/мл полисорбата-20.
7. Фармацевтическая композиция по п.3, содержащая:
примерно 2 мг/мл VT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
примерно 5,24 мг/мл гидрохлорида гистидина;
примерно 60 мг/мл сахарозы; и
примерно 0,1 мг/мл полисорбата-20.
8. Фармацевтическая композиция по п.3, содержащая:
примерно 2 мг/мл VT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
примерно 5,24 мг/мл гидрохлорида гистидина;
примерно 60 мг/мл сахарозы; и
примерно 0,2 мг/мл полисорбата-20.
9. Фармацевтическая композиция по п.3, содержащая:
примерно 4 мг/мл VT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
примерно 5,24 мг/мл гидрохлорида гистидина;
примерно 60 мг/мл сахарозы; и
примерно 0,2 мг/мл полисорбата-20.
10. Твердая фармацевтическая композиция, которая представляет собой лиофилизированный порошок, содержащая:
примерно 21,2 мг VT5528 или его фармацевтически приемлемой соли;
примерно 27,8 мг гидрохлорида гистидина;
примерно 318 мг сахарозы;
примерно 1,06 мг полисорбата-20.
11. Способ лечения распространенной солидной злокачественной опухоли, ассоциированной с экспрессией EphA2 у пациента, включающий внутривенное введение пациенту фармацевтической композиции по любому из пп.1-10.
12. Способ по п.11, в котором распространенную солидную злокачественную опухоль, ассоциированную с экспрессией EphA2, выбирают из немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака желудка/верхних отделов желудочно-кишечного тракта (GI), рака поджелудочной железы и уротелиального рака.
13. Способ по п.11 или 12, в котором фармацевтическую композицию вводят один раз каждые 7 дней.
14. Способ по любому из пп.11-13, в котором фармацевтическую композицию вводят в дозе примерно 2,2, 4,4, 7,3, 11, 14,6 или 19,4 мг/м².
15. Способ по любому из пп.11-14, в котором фармацевтическую композицию вводят путем IV-инфузии в течение примерно 60 мин.
16. Способ по любому из пп.11-14, дополнительно включающий введение ниволумаба.

