

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046718**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.16

(21) Номер заявки
202092700

(22) Дата подачи заявки
2019.05.10

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

(54) **СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ СЛИТЫЙ БЕЛОК РЕЦЕПТОРА ФРЭС В ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ**

(31) **62/669,506; 62/752,127; 62/769,876;
62/813,882**

(32) **2018.05.10; 2018.10.29; 2018.11.20;
2019.03.05**

(33) **US**

(43) **2021.02.02**

(86) **PCT/US2019/031879**

(87) **WO 2019/217927 2019.11.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Грэхем Кеннет С., Вадхва Саурабх
(US)**

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

(56) **WO-A1-2016208989
US-A1-2016244504
US-A1-2006217311
US-A1-2018099049
WO-A1-2017129685
CA-A1-2990582
WO-A2-2007149334**

NEAL WHITAKER ET AL.: "A Formulation Development Approach to Identify and Select Stable Ultra-High-Concentration Monoclonal Antibody Formulations With Reduced Viscosities", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 106, no. 11, 1 November 2017 (2017-11-01), pages 3230-3241,

XP055449627, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1016/j.xphs.2017.06.017, page 3235; tables 2-3, page 3240, left-hand column, paragraph 3, page 3234, last paragraph - page 3235, paragraph 1, page 3240, paragraph Conclusions

STEVEN SHIRE: "Formulation of proteins and monoclonal antibodies mAbs", 1 January 2015 (2015-01-01), MONOCLONAL ANTIBODIES: MEETING THE CHALLENGES IN MANUFACTURING, FORMULATION, DELIVERY AND STABILITY OF FINAL DRUG PRODUCT, PAGE(S) 93-120, XP009192951, the whole document, page 107, paragraph "Buffers for pH Control"

Anonymous: "HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION", 1 December 2016 (2016-12-01), XP055565606, Retrieved from the Internet: URL: https://web.archive.org/web/20161206164049if/https://www.regeneron.com/sites/default/files/EYLEA_FPI.pdf [retrieved on 2019-03-07]. Part Dosage and administration; page 1

STEWART MICHAEL W.: "Aflibercept (VEGF-TRAP): The Next Anti-VEGF Drug", INFLAMMATION & ALLERGY DRUG TARGETS, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 10, no. 6, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 497-508, XP009172512, ISSN: 1871-5281, DOI: 10.2174/187152811798104872, page 503, right-hand column, paragraph 5 - page 504, left-hand column, paragraph 1

WO-A1-2019124946

WO-A1-2019055902

WO-A1-2019020777

(57) Данное изобретение относится к офтальмологическим составам, имеющим высокие концентрации слитого белка рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (ФРЭС) и высокую стабильность при хранении. Также предложены способы лечения ангиогенных заболеваний глаз с применением высококонцентрированных составов.

046718 B1

046718 B1

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/813882, поданной 5 марта 2019 г.; предварительной заявке на патент США № 62/769876, поданной 20 ноября 2018 г.; предварительной заявке на патент США № 62/752127, поданной 29 октября 2018 г.; и предварительной заявке на патент США № 62/669506, поданной 10 мая 2018 г.; каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Варианты осуществления в данном документе в основном относятся к составам, содержащим слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, подходящим для окулярного введения. Более конкретно, варианты осуществления в данном документе обеспечивают жидкие фармацевтические составы для интравитреального введения, причем композиции включают более 40 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС и демонстрируют фармацевтически приемлемую эффективность, стабильность, вязкость и pH.

Перечень последовательностей

Официальная копия перечня последовательностей предоставляется одновременно со спецификацией в электронном виде посредством EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII с именем файла "10430P1-US_SEQ_LIST_ST25.txt", датой создания 9 мая 2018 г. и размером около 7 КБ. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью спецификации и полностью включен в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Для разработки терапевтически полезного жидкого состава требуется комбинация ингредиентов в различных количествах, чтобы обеспечить функциональный и стабильный носитель для доставки представляющего интерес лекарственного средства. Это особенно верно, когда лекарственное средство представляет собой белок и, более того, антитело. Составы антител уже давно являются проблемными для разработчиков и производителей лекарственных средств, поскольку активность и введение антител, как правило, требуют фармацевтически приемлемой активности, осмоляльности, стабильности белка, вязкости и надлежащего pH. Эти проблемы усугубляются, когда антитело присутствует в более высоких концентрациях в составе, например, выше 20-40 мг/мл, концентрации большинства фармацевтически продаваемых антител.

Составы антител с более высокими концентрациями позволяют сократить время инъекций, уменьшить объемы инъекций, снизить частоту введения антител и повысить эффективность производства и хранения. Однако, как отмечено выше, чем выше концентрация антитела или белка, тем труднее сохранить надлежащую активность и параметры доставки для состава. В частности, составы антител и белков с высокой концентрацией часто сталкиваются с повышенной агрегацией белка и вязкостью, что приводит к снижению общей активности антител или белка, а также к снижению производства и стабильности при хранении. Из-за проблем, связанных с составами с белками или антителами в высокой концентрации, было разработано несколько таких фармацевтически приемлемых составов. В данной области техники существует потребность в приготовлении составов антител и белков с высокой концентрацией и высокой стабильностью, которые имеют надлежащую активность, стабильность, вязкость, осмоляльность и pH.

Одним из таких белков, для которого необходимы высококонцентрированные составы, является слитый белок рецептора фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Слитые белки рецептора ФРЭС используются для блокирования функции ФРЭС в ряде офтальмологических составов, например, Эйлеа® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.). Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, могут обеспечить более короткое время инъекций в глаз, меньшие объемы инъекций, меньшее количество возможных инъекций на цикл введения и более эффективное производство и хранение.

Данное изобретение направлено на преодоление одной или более проблем, рассмотренных выше.

Краткое описание сущности изобретения

Различные варианты осуществления, описанные в данном документе, охватывают составы, содержащие белок в высокой концентрации (например, которые подходят для интравитреального введения), и, в частности, составы, содержащие слитый белок рецептора фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС) в высокой концентрации. Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, обеспечивают ряд терапевтических и экономических преимуществ, включая фармацевтически приемлемую эффективность, долгосрочное производство и стабильность при хранении, а также вязкость и pH, совместимые с окулярной инъекцией. Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, также позволяют уменьшить объемы введения в глаз, что позволяет избежать нежелательных эффектов на ограниченный объем глаза.

Варианты осуществления в данном документе относятся к составам, содержащим слитый белок рецептора ФРЭС, буфер, термостабилизатор, снижающий вязкость агент, и поверхностно-активное вещество. В других вариантах осуществления составы не содержат снижающий вязкость агент. Составы согласно данному изобретению имеют pH и вязкость, подходящие для инъекций и, в частности, для терапевтических окулярных инъекций.

В варианте осуществления изобретения представлен фармацевтический состав согласно данному изобретению, содержащий слитый белок рецептора ФРЭС в концентрации по меньшей мере 41 мг/мл

или в концентрации, которая содержит однократную дозу слитого белка рецептора ФРЭС (который обсуждается в данном документе) в менее чем около 100 мкл, менее около 50 мкл, около 50 мкл, около 57 мкл, около 60 мкл, около 70 мкл, или около 75 мкл, буфер, необязательно термостабилизатор и/или снижающий вязкость агент, и поверхностно-активное вещество, при этом композиция имеет рН от около 5,0 до около 6,8 (например, 5,8).

В варианте осуществления изобретения концентрация слитого белка рецептора ФРЭС составляет около 30 мг/мл, 60 мг/мл, 114 мг/мл, 120 мг/мл или 140 мг/мл.

В варианте осуществления изобретения поверхностно-активное вещество может представлять собой неионное поверхностно-активное вещество (например, от около 0,02 до около 0,1% или около 0,03% (мас./об.)). В варианте осуществления изобретения поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество, имеющее полиоксиэтиленовый фрагмент, например, полисорбат 20 (PS20), полисорбат 80 (PS80), полоксамер 188, полиэтиленгликоль 3350 или их смеси.

В варианте осуществления изобретения буфер представляет собой буфер на основе гистидина (например, 10 мМ или 20 мМ), такой как гистидин, гистидин HCl или гистидин ацетат; буфер на основе фосфата, такой как натрий фосфат (например, 10 мМ); буфер на основе ацетата, такой как натрий ацетат и уксусная кислота, или буфер на основе цитрата, такой как натрий цитратили лимонная кислота. В варианте осуществления изобретения, если буфер представляет собой фосфатный буфер, рН составляет от около 5,7 до около 8,0, от около 5,8 до около 8,0, от около 5,7 до около 7,0, от около 5,8 до около 7,0, от около 5,9 до около 7,0 или около 6,0, до около 7,0; если буфер представляет собой гистидиновый буфер, рН составляет от около 5,5 до около 6,5; если буфер представляет собой цитратный буфер, рН составляет от около 3,0 до около 6,2 или от около 5,0 до около 6,0; и если буфер представляет собой ацетатный буфер, рН составляет от около 3,7 до около 5,6 или от около 5,0 до около 6,0.

В варианте осуществления изобретения термостабилизатор представляет собой сахар, такой как сахароза (например, около 2,5%, 5% или 8%, 10% или 20% (мас./об.), например, около 2-20%), маннит, сорбит или трегалоза; L-пролин (например, около 2%, 3% или 4% (мас./об.)); глицин (например, около 50 мМ), глицерин, таурин (например, около 50 мМ) или пропансульфоновую кислоту (например, около 50 мМ) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические составы согласно данному изобретению включают снижающий вязкость агент, например, аргинин гидрохлорид (например, L-аргинин моногидрохлорид) (например, 50 мМ), лизин, натрий хлорид (например, 40 мМ или 50 мМ) или магний хлорид. В качестве альтернативы, в других вариантах осуществления согласно данному изобретению специально исключают практически все, если не все, снижающие вязкость агенты.

В варианте осуществления изобретения фармацевтические составы согласно данному изобретению содержат, состоят из или по существу состоят из компонентов в любом из составов А-КККК, как изложено в данном документе.

В аспектах данного документа фармацевтические составы согласно данному изобретению могут содержать слитый белок рецептора ФРЭС (например, афлиберцепт или конберцепт) в концентрации от около 41 до около 275 мг/мл, от около 80 до около 275 мг/мл, от около 140 до около 150 мг/мл, от около 140 до около 159 или 160 мг/мл; включая около 60 мг/мл, около 80 мг/мл, около 100 мг/мл, около 113,3 мг/мл, около 114,3 мг/мл, около 120 мг/мл, около 133,3 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 200 мг/мл или около 250 мг/мл. В варианте осуществления изобретения состав содержит около 40 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС.

Некоторые аспекты фармацевтических составов согласно данному изобретению содержат термостабилизатор в концентрации от около 2% (мас./об.) до около 9% (мас./об.) или от около 4% (мас./об.) до около 9% (мас./об.) при условии, что, когда термостабилизатор представляет собой таурин или пропансульфоновую кислоту, стабилизатор находится в концентрации от около 25 мМ до около 100 мМ, поверхностно-активное вещество находится в концентрации от около 0,02% (мас./об.) до около 0,1% (мас./об.) (например, около 0,03%), а буфер составляет от около 5 мМ до около 15 мМ.

Слитый белок рецептора ФРЭС может, например, кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или нуклеотидами 79-1374 или 79-1371 SEQ ID NO: 1;

содержать аминокислоты SEQ ID NO: 2 или аминокислоты 27-457 или 27-458 SEQ ID NO: 2;

содержать:

(1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты 27-129 SEQ ID NO: 2;

(2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 SEQ ID NO: 2;

(3) мультимеризующий компонент ("FcΔC1(a)"), содержащий аминокислоты 232-457 или 458 SEQ ID NO: 2 (С-концевые аминокислоты SEQ ID NO: 2, то есть K458, могут или не могут быть включенным в слитые белки рецептора ФРЭС). Обратите внимание, что аминокислоты 1-26 SEQ ID NO: 2 представляют собой сигнальную последовательность;

содержат иммуноглобулиноподобный (Ig) домен 2 первого рецептора ФРЭС (например, VEGFR1) и домен 3 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2), необязательно дополнительно содержащий домен 4 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2) и мультимеризующий компонент (например,

Fc-домен IgG);

представляют собой конберцент или
представляют собой афлиберцент.

Ловушка ФРЭС

```
atggtcagctactgggacaccggggtcctgctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctc
acaggatctagtccggaagtgtaccggtagaccttctgtagagatgtacagtgaaatc
cccgaattatacacatgactgaaggaaggagctcgtcattccctgccgggttacgtca
cctaacatcactgttactttaaaaaagttccacttgacactttgatccctgatgaaaaa
cgcataatctgggacagtagaaaggcttcatcatacaaatgcaacgtacaaagaata
gggcttctgacctgtgaagcaacagtcaatgggcattgtataagacaactatctcaca
catcgacaaccaafacaatcatagatgtggttctgagtcctctcatggaattgaaacta
tctgtggagaaaagcttcttaattgtacagcaagaactgaactaaatgtggggatt
gacttcaactgggaatacccttctcgaagcatcagcataagaaactgtaaaccgagac
ctaaaaaccctgctgggagtgagatgaagaaatgttgacacctaactatagatggt
gtaaccggagtgaccaaggattgtacacctgtgcagcatccagtgggctgatgaccaag
aagaacagcacattgtcagggccatgaaaaggcaaaaactcacacatgccaccctgtgc
ccagcacctgaactcctgggggaccgtcagcttctctcccccaaaaccaaggac
accctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaa
gacctgaggtcaagttaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagaca
aagccgctgggagagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagctcctcaccgtcctg
caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggctccaacaagccctccca
gccccatcgagaaaacctctccaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtac
accctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagctgacctgcctgctg
aaagcttctatcccagcagatcgcctggagtgaggagcaatgggcagccgggagaac
aactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgatgcat
gaggctctgcacaaccactacagcagaagagcctctcctctcctgggtaaatga
```

(SEQ ID NO: 1)

```
MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPC
RVTPSPNITVTLKKFPLDLPDGGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNV
LTHRQNTNIIDVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSKHKQHKLVN
RDLKTQSGSEMKKFSLTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

(SEQ ID NO: 2)

AK 1-26=сигнальная последовательность

AK 27-129=Flt1-D2 (VEGFR1-D2)

AK 130-231=Flk1-D3 (VEGFR2-D3)

AK 232-458=Fc Δ C1

В другом варианте осуществления данного изобретения контейнер, содержащий водный раствор от около 5 мМ до около 25 мМ фармацевтически приемлемого буфера, от около 4% (мас./об.) до около 9% (мас./об.) фармацевтически приемлемого термостабилизатора, от около 0,02% (мас./об.) до около 0,1% (мас./об.) фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества и от около 41 мг/мл до около 275 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС. Если термостабилизатор включает таурин или пропансульфоную кислоту, таурин или пропансульфоную кислоту находится в концентрации от около 25 мМ до около 100 мМ. Водный раствор имеет pH от около 5,0 до около 6,8 и может составлять от около 5,5 до около 6,2 (например, 5,8). В некоторых аспектах контейнер представляет собой флакон или шприц. В других аспектах водный раствор не содержит неорганическую соль. Когда термостабилизатор представляет собой сахар, он может представлять собой сахарозу, маннит, сорбит или трегалозу и может присутствовать в количестве от около 4% (мас./об.) до 9% (мас./об.); поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом и может включать полиоксиэтиленовый фрагмент, такой как полисорбат 20, полисорбат 80, полуксамер 188 или полиэтиленгликоль 3350, в концентрации от около 0,02 до около 0,1% массы на объем (мас./об.) и более типично от 0,02 до около 0,04% (мас./об.). В варианте изобретения слитый белок рецептора ФРЭС кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или нуклеотидами 79-1374, или 79-1371 из SEQ ID NO: 1; содержит аминокисло-

ты SEQ ID NO: 2 или аминокислоты 27-457 или 27-458 из SEQ ID NO: 2; содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты с 27 по 129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) мультимеризующий компонент ("FcΔC1(a)"), содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2 (С-концевые аминокислоты SEQ ID NO: 2, то есть K458, могут быть или не быть включены в слитые белки рецептора ФРЭС); содержит иммуноглобиноподобный (Ig) домен 2 первого рецептора ФРЭС (например, VEGFR1) и домен 3 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2), необязательно дополнительно содержащий домен 4 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2) и мультимеризующий компонент (например, Fc-домен IgG); представляет собой конберцепт или афлиберцепт.

В еще других вариантах осуществления предложены фармацевтические составы согласно данному изобретению, которые содержат слитый белок рецептора ФРЭС в водном носителе, где водный носитель имеет вязкость от около 10 до около 15 сП при 20°C, более типично от около 10 до около 13 сП при 20°C, и наиболее типично от около 11 до около 12 сП при 20°C (например, около 6,0, 7,3, 11,5 или 12,0 сП при 20°C). В одном варианте осуществления изобретения вязкость составляет от около 12 до около 15 сП при 20°C. pH состава может составлять от около 5,8 до около 6,5 (например, около 5,8). В некоторых случаях составы не содержат снижающий вязкость агент, например, не содержат аргинин гидрохлорид, лизин, натрий хлорид или магний хлорид. В других случаях составы содержат 10 мМ гистидин гидрохлорида или 10 мМ гистидин-ацетата. Сахар может представлять собой сахарозу, маннит, сорбит или трегалозу и может присутствовать в количестве от около 4% (мас./об.) до 9% (мас./об.) (например, около 5%); поверхностно-активное вещество может быть неионным поверхностно-активным веществом и может содержать полиоксиэтиленовый фрагмент, такой как полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188 или полиэтиленгликоль 3350, в концентрации от около 0,02 до около 0,1% массы на объем (мас./об.) и более типично от 0,02 до около 0,04% (мас./об.) (например, 0,03%). Кроме того, состав может дополнительно содержать термостабилизатор, выбранный из таурина или пропансульфоновой кислоты, в концентрации от около 25 до около 100 мМ и более типично от около 50 до около 70 мМ. В варианте осуществления изобретения состав содержит слитый белок рецептора ФРЭС, такой как афлиберцепт (например, в концентрации около 41-275 мг/мл, около 50 мг/мл, около 100 мг/мл, около 115 мг/мл, около 125 мг/мл, около 150 мг/мл, около 200 мг/мл или любой из "высоких" концентраций, обсуждаемых в данном документе), около 10 мМ буфера на основе гистидина, около 5% (мас./об.) сахарозы, около 0,03% (мас./об.) неионного поверхностно-активного вещества, такого как полисорбат, например, полисорбат 20, и около 50 мМ аргинина, L-аргинина или L-аргинин моногидрохлорида с pH около 5,8. В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или нуклеотидами 79-1374, или 79-1371 из SEQ ID NO: 1; содержит аминокислоты SEQ ID NO: 2 или аминокислоты 27-457, или 27-458 из SEQ ID NO: 2; содержит (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты с 27 по 129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) мультимеризующий компонент ("FcΔC1(a)"), содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2 (С-концевые аминокислоты SEQ ID NO: 2, то есть K458, могут быть или не быть включены в слитые белки рецептора ФРЭС); содержит иммуноглобиноподобный (Ig) домен 2 первого рецептора ФРЭС (например, VEGFR1) и домен 3 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2), необязательно дополнительно содержащий домен 4 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2) и мультимеризующий компонент (например, Fc-домен IgG); представляет собой конберцепт или афлиберцепт.

В еще одном варианте осуществления предложен фармацевтический состав согласно данному изобретению, который содержит слитый белок рецептора ФРЭС в концентрации от около 80 мг/мл до около 275 мг/мл в фармацевтически приемлемом буфере. В некоторых случаях стабильные фармацевтические составы могут также содержать таурин или пропансульфоновую кислоту. Составы могут быть стабильными при температуре около 2 до около 8°C в течение около 24-36 месяцев. В некоторых случаях слитый белок рецептора ФРЭС демонстрирует менее чем около 5% увеличение высокомолекулярных соединений, и более типично менее чем 4,5% высокомолекулярных соединений, менее чем около 4,0% высокомолекулярных соединений, менее чем около 3,5% увеличение высокомолекулярных соединений, менее чем около 3,0% увеличение высокомолекулярных соединений, менее чем около 2,5% увеличение высокомолекулярных соединений, менее чем около 2,0% увеличение высокомолекулярных соединений и/или менее чем около 1,5% увеличение высокомолекулярных соединений, если составы хранятся при этих температурах и в течение этого количества времени. В других случаях слитый белок рецептора ФРЭС демонстрирует менее чем 2,0-3,0% увеличение в высокомолекулярных соединениях, если составы хранятся при этих температурах и в течение этого количества времени.

Варианты осуществления в данном документе также могут включать фармацевтические составы согласно данному изобретению, которые содержат афлиберцепт, pH буферный раствор, сахар и поверхностно-активное вещество, при этом афлиберцепт находится в концентрации от 41 до около 275 мг/мл. Альтернативно, варианты осуществления могут представлять собой стабильные жидкие фармацевтические составы, которые содержат конберцепт, pH буферный раствор, сахар и поверхностно-активное вещество, при этом конберцепт находится в концентрации от 41 до около 275 мг/мл. Стабильные жидкие

фармацевтические составы могут также содержать таурин или пропансульфоновою кислоту. В некоторых аспектах афлиберцепт или конберцепт присутствует в концентрации или 80 мг/мл, или 150 мг/мл. В других аспектах составы не содержат неорганическую соль, например, хлорид натрия.

Некоторые варианты осуществления относятся к стерильным шприцам, так что шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 80 мг/мл афлиберцепта, конберцепта, 10 мМ гистидин гидрохлорида, гистидин ацетата или натрий фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, маннита, сорбитола или трегалозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350 и 40 мМ натрий хлорида. Аспекты в данном документе включают дополнительное добавление от около 25 до около 100 мМ и более типично от около 50 до около 70 мМ, или таурина, или пропансульфоновою кислоты. В некоторых аспектах шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 80 мг/мл афлиберцепта, конберцепта, 10 мМ гистидина HCl, гистидин ацетата или натрий фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы, маннита, сорбита или трегалозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350. Аспекты в данном документе включают дополнительное добавление от около 25 до около 100 мМ и более типично от около 50 до около 70 мМ, или таурина, или пропансульфоновою кислоты. В еще других аспектах шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 150 мг/мл афлиберцепта, конберцепта, 10 мМ гистидин гидрохлорида, гистидин ацетата или натрий фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, маннита, сорбита или трегалозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350 и 40 мМ натрий хлорида с pH около 6,2. Аспекты в данном документе могут включать дополнительное добавление таурина или пропансульфоновою кислоты. В других еще некоторых аспектах шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 150 мг/мл афлиберцепта, конберцепта, 10 мМ гистидин гидрохлорида, гистидин ацетата или натрий фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы, маннита, сорбита или трегалозы, и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350 с pH около 6,2, и водный раствор не содержит неорганическую соль. Аспекты могут дополнительно содержать от около 25 мМ до около 100 мМ, и более типично от около 50 до около 70 мМ таурина или пропансульфоновою кислоты. В других еще некоторых аспектах шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 150 мг/мл афлиберцепта или конберцепта, 10 мМ натрий ацетата или уксусной кислоты, 5% (мас./об.) глицерина и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350 и 40 мМ натрий хлорида с pH около 6,2. В других еще некоторых аспектах шприцы предварительно заполнены водным раствором, содержащим 150 мг/мл афлиберцепта или конберцепта, 10 мМ натрий ацетата или уксусной кислоты, 8% (мас./об.) глицерина и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188 или полиэтиленгликоля 3350 и 40 мМ натрий хлорида с pH около 6,2.

Данное изобретение также обеспечивает способ изготовления любого изложенного в данном документе состава, включающий стадию объединения каждого компонента состава в единую композицию. Такой способ может включать стадию добавления полученного состава во флакон или устройство для инъекции. Любая композиция, которая является продуктом такого способа, также составляет часть данного изобретения. Например, варианты осуществления в данном документе также включают способы получения состава путем комбинирования буфера на основе гистидина, цитрата, ацетата или фосфата с сахарозой, полисорбатом 20 и слитым белком рецептора ФРЭС; и, необязательно, с одним или более дополнительными компонентами, например, как описано в данном документе. В некоторых случаях состав получает также с включением таурина или пропансульфоновою кислоты, но если он не содержит таурин или пропансульфоновою кислоту, он также может не содержать неорганическую соль. В аспектах данного документа сахароза имеет массу на объем состава от около 4 до около 10%, полисорбат 20 имеет массу на объем состава от около 0,02 до около 0,1%, а слитый белок рецептора находится в концентрации от около 41 до около 275 мг/мл. Если состав содержит таурин или пропансульфоновою кислоту, он(а) присутствует, например, в концентрации от около 25 до около 100 мМ, но также может быть включен в концентрации от 50 до 70 мМ. Способ может включать загрузку заранее определенного объема приготовленного состава в стерильный шприц, так чтобы объем содержал дозу от 0,1 до 10 мг слитого белка рецептора ФРЭС.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ введения состава согласно данному изобретению субъекту (например, человеку), включающий внутривитреальную инъекцию (например, интравитреальную инъекцию) состава в глаз субъекта. Данное изобретение также обеспечивает способ введения композиции согласно данному изобретению субъекту (например, человеку), включающему имплантацию интравитреального имплантата, который содержит состав согласно данному изобретению, в стекловидное тело субъекта.

Варианты осуществления в данном документе также включают способы лечения ангиогенного заболевания глаз, например возрастной дегенерации желтого пятна (влажная форма), макулярного отека желтого пятна после окклюзии вены сетчатки, окклюзии вены сетчатки (ОВС), окклюзии центральной вены сетчатки (ОЦВС), окклюзии ветки вены сетчатки (ОВВС), диабетического макулярного отека (ДМО), хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ), неоваскуляризации радужной оболочки, неоваскулярной глаукомы, послеоперационного фиброза при глаукоме, пролиферативной витреоретинопатии

(ПВР), неоваскуляризации на диске зрительного нерва, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, витреальной неоваскуляризации, паннуса, птеригиума, сосудистой ретинопатии или диабетической ретинопатии (например, непролиферативной диабетической ретинопатии и/или пролиферативной диабетической ретинопатии) у субъекта, нуждающегося в этом, путем внутриглазной инъекции по меньшей мере около 2 мг (например, 4 мг, 6 мг или 8 мг) слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта или конберцепта) в глаз субъекта, нуждающегося в этом, например, любого состава, приведенного в данном документе. В варианте осуществления изобретения объем инъекции составляет 100 мклв или меньше (например, 100 мкл, 50 мкл или 57 мкл). Способ включает интравитреальную инъекцию предварительно смешанного водного раствора, содержащего слитый белок рецептора ФРЭС в концентрации от 41 до около 275 мг/мл, фармацевтически приемлемый сахар, фармацевтически приемлемый буфер и фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество. Способы лечения с использованием предварительно смешанного водного раствора не требуют разбавления. В аспектах данного документа предварительно смешанный водный раствор имеет рН от около 6,0 до около 6,5 и вязкость от около 10 до 13 сП.

В аспектах способа лечения слитый белок рецептора ФРЭС включает VEGFR1R2-FcΔC1 (а), кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, аминокислоты с 27 по 129 из SEQ ID NO: 2, компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2, или мультимеризующий компонент, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2, или любую их комбинацию. В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС представляет собой афлиберцепт или конберцепт.

Другие варианты осуществления в соответствии с описанием в данном документе станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Вышеупомянутые и другие аспекты, особенности и преимущества вариантов осуществления, описанных в данном документе, станут более очевидными для специалистов в данной области техники со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

На фиг. 1А представлен график, определяющий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС (афлиберцепт) в четырех различных составах (В, Н, D и G) в течение 36 месяцев при 2-8°C. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с помощью эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) для идентификации образования высокомолекулярных (ВМ) соединений (признак деградации белка).

На фиг. 1В также представлен график, определяющий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС (афлиберцепт) в четырех составах (В, Н, D и G) в течение 36 месяцев при 2-8°C. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с использованием SE-UPLC для определения процента основного соединения в каждом составе.

На фиг. 1С представлена гистограмма, демонстрирующая формирование отличающихся зарядом вариантов слитого белка рецептора ФРЭС в четырех составах (В, Н, D и G) в течение 36 месяцев при 2-8°C. Уровень кислотных соединений был протестирован на этапе производстве (0,0), через 12 месяцев, 24 месяца и 36 месяцев с использованием изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра (iCIEF).

На фиг. 1D представлена гистограмма, демонстрирующая формирование отличающихся зарядом вариантов слитого белка рецептора ФРЭС в четырех составах (В, Н, D и G) в течение 36 месяцев при 2-8°C. Идентификация основного соединения была проверена на этапе производства (0,0), через 12 месяцев, 24 месяца и 36 месяцев с использованием iCIEF.

На фиг. 2А представлен график, демонстрирующий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС (афлиберцепт) в концентрации 150 мг/мл в составе с 10 мМ фосфата натрия, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% полисорбата 20 (мас./об.), рН 6,2 с L-аргинин моногидрохлоридом и без него в течение 28 суток при 37°C. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с использованием SE-UPLC для идентификации образования ВМ соединений.

На фиг. 2В представлен график, демонстрирующий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС в концентрации 150 мг/мл в составе с 10 мМ фосфата натрия, 8% сахарозы (мас./об.) и 0,03% полисорбата 20 (мас./об.), рН 6,2 с L-аргинин моногидрохлоридом и без него в течение 28 суток при 37°C. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с использованием SE-UPLC для определения процента основного соединения в каждом составе.

На фиг. 3А представлена гистограмма, демонстрирующая вязкость составов, забуференных 10 мМ фосфата натрия, содержащих 155 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС и не содержащего соли, 100 мМ аргинина, 200 мМ аргинина, 50 мМ лизина, 200 мМ лизина, 50 мМ натрий хлорида или 100 мМ натрий хлорида. Вязкость измеряли в сП при 20°C.

На фиг. 3В представлена гистограмма, демонстрирующая вязкость составов, забуференных 10 мМ гистидина, содержащих 155 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС и не содержащего соли, 100 мМ аргинина, 200 мМ аргинина, 50 мМ лизина, 200 мМ лизина, 50 мМ натрий хлорида или 100 мМ натрий хло-

рида. Вязкость измеряли в сП при 20°C.

На фиг. 3С представлен график, демонстрирующий вязкость различных концентраций слитого белка рецептора ФРЭС в различных условиях получения составов (с 50 мМ аргинин гидрохлорида или без него). Вязкость измеряли в сП при 20°C.

На фиг. 4А представлен график, демонстрирующий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС в концентрации 150 мг/мл в 10 мМ фосфата натрия, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, рН 6,2 с 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида более 12 месяцев при 5°C. Слитый белок рецептора ФРЭС был в концентрации 150 мг/мл. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с использованием SE-UPLC для идентификации образования ВМ соединений.

На фиг. 4В представлен график, демонстрирующий стабильность слитого белка рецептора ФРЭС в концентрации 150 мг/мл в 10 мМ фосфата натрия, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, рН 6,2 с 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида более 12 месяцев при 5°C. Слитый белок рецептора ФРЭС был в концентрации 150 мг/мл. Стабильность слитого белка рецептора ФРЭС тестировали с использованием SE-UPLC для определения процента основного соединения в каждом составе.

На фиг. 5 представлен график, который демонстрирует вязкость составов при двух условиях буферов при 20°C, с 10 мМ фосфатного буфера или 10 мМ гистидинового буфера. Концентрация слитого белка рецептора ФРЭС варьируется от 10 до 170 мг/мл. Вязкость измеряли в мПа·с.

На фиг. 6 показан скрининг методом динамического светорассеяния для ряда различных условий получения составов, каждое из которых содержит от 2 до 10 мг/мл белка. Параметр диффузионного взаимодействия продемонстрировал, что таурин и PSA (пропансульфоновая кислота) улучшают Kd.

На фиг. 7 представлен график мониторинга процентного содержания высокомолекулярных (ВМ) соединений в составах F1-F9 (составы WW-EEE) с течением времени, измеренный с помощью эксклюзивной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) после хранения при 5°C в течение 6 месяцев. Составы F1-F9 представлены в данном документе в табл. 7-1.

На фиг. 8 (А-В) отображено процентное содержание высокомолекулярных соединений согласно SE-UPLC после хранения при 5°C в течение 3 месяцев (А) или инкубации при 37°C в течение 28 суток (В). Составы F1-F4 (EEE, SSS, CCC (140 мг/мл) и TTT) представлены в табл. 8-1 ниже.

На фиг. 9 показана вязкость (сП) для составов F1-F12 при 20°C в начальный момент времени. Составы F1-F12 представлены в табл. А ниже.

Таблица А. Составы F1-F12.

Состав №	Ловушка ФРЭС (мг/мл)	Буфер	Другие эксципиенты	Скрининговые эксципиенты (мМ)
F1 (GGG)	140	20 мМ	5% сахарозы, 0,03%	50 мМ натрий
		гистидина, рН 5,8	полисорбата 20	сульфата
F2 (ННН)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий тиоцианата
F3 (III)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	40 мМ натрий цитрата
F4 (JJJ)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ глицина
F5 (KKK)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий хлорида
F6 (LLL)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ лизина
F7 (MMM)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий аспартата
F8 (NNN)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий глутамата
F9 (OOO)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий цитрата+50 мМ аргинин гидрохлорида
F10 (PPP)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ глицина+50 мМ аргинин гидрохлорида
F11 (QQQ)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий аспартата+50 мМ аргинин гидрохлорида
F12 (RRR)	140	20 мМ гистидина, рН 5,8	5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20	50 мМ натрий глутамата+50 мМ аргинин гидрохлорида
		5,8		аргинин гидрохлорида

На фиг. 10 показана осмоляльность (ммоль/кг) составов F1-F12 (приведенных в данном документе в табл. А).

На фиг. 11 (А-В) отображено процентное содержание высокомолекулярных соединений в составах F1-F6 (составы GGG, ННН, III, JJJ, LLL и KKK) с течением времени, согласно SE-UPLC, после хранения при 37°C в течение 28 суток (А) или 5°C в течение до 3 месяцев (В) в зависимости от времени.

На фиг. 12 показано динамическое рассеяние света (коэффициент диффузии (см /сек), радиус (нм) и % Pd) в начальный момент времени для составов, приведенных в табл. 9-3 (GGG-RRR).

На фиг. 13 показаны исходные изображения ФАГ и ОКТ (линза 30 градусов) для двух разных кроликов (326-OS и 329-OD) до введения афлиберцепта (OD=oculus dexter (правый глаз); OS=oculus sinister (левый глаз)). (А) изображение ФАГ для кролика 326, левый глаз; (В) изображение ОКТ для кролика 326, левый глаз; (с) изображение ФАГ для кролика 329, правый глаз; (D) изображение ОКТ для кролика 329, правый глаз.

На фиг. 14 (А-Е) показана временная серия изображений ФАГ для кролика на 1-е (А), 7-е (В) и 14-е

(С) сутки, а также ОКТ на 1-е (D), 7-е (E) и 14-е (F) для одного кролика (326-OS), которому вводили состав с гистидиновым буфером (линза 30 градусов) (7 мг/глаз).

На фиг. 15 (A-H) показана временная серия изображений ФАГ для кролика через 3 недели (A), 4 недели (B), 7 недель (C) и 8 недель (D); и ОКТ через 3 недели (E), 4 недели (F), 7 недель (G) и 8 недель (H) для одного кролика (326-OS), которому вводили композицию с гистидиновым буфером (линза 55 градусов) (7 мг/глаз).

На фиг. 16 (A-F) показана временная серия изображений ФАГ кроликов на 1-е сутки (A), 1-ю неделю (B) и 2-ю неделю (C), а также ОКТ на 1-е сутки (D), 1-ю неделю (E) и 2-ю неделю (F) для одного кролика (329-OS), которому вводили состав с фосфатным буфером (линза 30 градусов) (7 мг/глаз).

На фиг. 17 (A-H) показана временная серия изображений ФАГ для кроликов на 3-й неделе (A), 4-й неделе (B), 7-й неделе (C) и 8-й неделе (D), а также ОКТ на 3-й неделе (E), 4-й неделе (F), 7-й неделе (G) и 8-й неделе (H) для одного кролика (329-OS), которому вводили состав с фосфатным буфером (линза 55 градусов) (7 мг/глаз).

На фиг. 18 (A-B) показана чистота (процент нативных соединений) (A) и процентное содержание высокомолекулярных (BM) соединений (B) в составах UUU-BBBB с течением времени при 37°C (до одного месяца) (см. табл. 11-1) согласно SE-UPLC.

На фиг. 19 (A-E) показан анализ стабильности и чистоты состава, содержащего 114,3 мг/мл ловушки ФРЭС (афлиберцепта), составленного в 10 mM гистидина, pH 5,8, 5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 mM аргинин моногидрохлорида путем определения процентного содержания при помощи эксклюзивной хроматографии (i) высокомолекулярных (BM) соединений после инкубации при 5 или 37°C в течение до 2 месяцев (A) и (ii) основного соединения (основной пик) после инкубации при 5 или 37°C до 2 месяцев (B); а также с помощью визуализации микропотоков для определения наличия невидимых твердых частиц после инкубации при 37°C в течение до 28 суток (C), с помощью анализа частиц методом светоблокировки для определения присутствия невидимых твердых частиц после инкубации при 37°C в течение до 28 суток (D) и путем микроскопического определения невидимых твердых частиц после инкубации при 37°C в течение до 28 суток (E).

На фиг. 20 показан анализ стабильности и чистоты состава CCC, содержащего 80, 100, 120 или 140 мг/мл афлиберцепта, посредством определения методом SE-UPLC процентного содержания высокомолекулярных (BM) соединений после инкубации при 2-8°C в течение до 6 месяцев (A) или 37°C в течение до 28 суток (B).

На фиг. 21 показан процент глаз кроликов, испытанных с полным подавлением пропотевания с течением времени, при введении 500 мкг или 2 мг афлиберцепта с течением времени (тест Гехана-Бреслоу-Уилкоксона (P 0,0453)).

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение обеспечивает составы, имеющие высокие концентрации слитых белков рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), демонстрирующие превосходные функциональные свойства и сохраняемость, которые были получены, несмотря на значительные технические трудности. Например, общий способ определения подходящих эксципиентов для состава, который включает полипептидное лекарственное средство (например, слитый белок рецептора ФРЭС), заключается в оценке стабильности полипептида в условиях "ускоренного старения", таких как высокая температура (например, 37°C). Эксципиенты, которые не подходят для исследования в нестрессовых условиях (например, при низкой температуре, такой как 5°C), как правило, вызывают нежелательный эффект в течение короткого периода времени в условиях стресса, например агрегацию белков. Этот подход распространен в биотехнологической и фармацевтической промышленности, поскольку он ускоряет исключение эксципиентов, которые вряд ли стабилизируют лекарственный препарат. См., например, Magari, *Assessing Shelf Life Using Real-Time and Accelerated Stability Tests*, Biopharm Intl. 16(11): 36-48 (2003). В некоторых случаях продукт может быть выпущен на основе данных из испытаний стабильности методом "ускоренного старения", но это необходимо делать параллельно с испытанием срока годности в реальном времени (без ускорения). Magari (2003) and FDA, *Guidelines for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics*, Rockville, MD (1987). Однако в данном документе при 5°C присутствие аргинина в гистидиновых составах стабилизировало, хотя аргинин, как оказалось, имел тенденцию к снижению стабильности при температурном стрессе (37°C). См. фиг. 8 (A-B). Это свойство составов, приведенных в данном документе, могло бы создать техническую трудность, уводящую практикующего врача от выбора аргинина; таким образом, маловероятно, что практикующий врач выбрал бы аргинин в качестве эксципиента. Тем не менее, составы, приведенные в данном документе, явились результатом преодоления таких технических трудностей, как эта, для получения состава с высокой стабильностью. Получение состава с ловушкой ФРЭС в гистидиновом буфере также привело к благоприятному снижению вязкости по сравнению с тем, которое наблюдается для состава с фосфатным буфером. Поскольку для выполнения интравитреальных инъекций предпочтительны небольшие отверстия иглы (для уменьшения дискомфорта пациента и травм глаза), желательна относительно низкая вязкость. Состав с более низкой вязкостью требует меньшего усилия для проталкивания состава через иглу, что облегчает инъекцию состава через иглу для лечащего

врача. Кроме того, состав, содержащий гистидин и аргинин, хорошо переносился глазами кролика.

Теперь будет сделана подробная ссылка на иллюстративные варианты осуществления. Следует понимать, что нижеследующие описания не предназначены для ограничения вариантов осуществления одним предпочтительным вариантом осуществления. Напротив, они предназначены для охвата альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в сущность и объем описанных вариантов осуществления, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которой относится изобретение. Используемый в данном документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Так, например, в данном контексте выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4% и т.д.).

В варианте осуществления изобретения фармацевтический состав согласно данному изобретению соответствует USP <789> для инъекций малого объема (SVP) офтальмологических растворов, например, содержит менее чем около 50 частиц ≥ 10 мкм в диаметре на мл; содержит менее около 5 частиц ≥ 25 мкм в диаметре на мл; или содержит менее около 2 частиц ≥ 50 мкм в диаметре на мл.

Обратите внимание, что для целей данного описания "интравитреальная инъекция" относится к инъекции в стекловидное тело глаза (рядом с сетчаткой в задней части глаза). Выражения "подходит для интравитреального введения", "подходит для интравитреальной инъекции" и т.п. означают, что рассматриваемый состав можно безопасно вводить в стекловидное тело глаза субъекта, не вызывая каких-либо нежелательных реакций, помимо тех, которые, как известно, связаны с интравитреальной инъекцией Эй-леа.

Термин "фармацевтический состав" в данном документе относится к составам, включающим фармацевтически приемлемые носители, например, используемым для введения слитых белков рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта или конберцепта) субъекту для применения в терапевтических/медицинских целях.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к составу, который в рамках здорового медицинского заключения подходит для введения в глаз.

Термин "субъект" в данном документе относится к любому субъекту-млекопитающему (например, кролику, мыши, крысе или обезьяне), в частности человеку, например, для которого желательны диагностика, прогноз или лечение с помощью описанных в данном документе составов.

Термин "водный" состав относится к составу, который содержит воду.

Термин "лечить" или "лечение" относится к терапевтической мере, которая обращает, стабилизирует или устраняет нежелательное заболевание или нарушение (например, ангиогенное заболевание или злокачественное новообразование глаз), например, вызывая регресс, стабилизацию или устранение одного или более симптомов или признаков такого заболевания или нарушения согласно любой клинически определяемой степени, например, в отношении ангиогенного заболевания глаз, вызывая снижение или поддержание по шкале оценки тяжести диабетической ретинопатии (DRSS), улучшая или поддерживая зрение (например, в остроте зрения с максимальной коррекцией, например, измеренной по увеличению букв по шкале ETDRS), увеличивая или сохраняя поле зрения и/или уменьшая или поддерживая толщину центральной области сетчатки и, в отношении злокачественного новообразования, останавливая или вызывая регресс роста, выживаемости и/или метастазирования раковых клеток у субъекта. Как правило, терапевтическая мера представляет собой введение одной или более доз терапевтически эффективного количества слитого белка рецептора ФРЭС субъекту с заболеванием или нарушением.

"Предотвращать" или "предотвращение" относятся к профилактической мере для прекращения развития нежелательного заболевания или нарушения (например, ангиогенного заболевания глаз).

SE-UPLC можно использовать в данном изобретении для количественного определения присутствия высокомолекулярных соединений в составе. SE относится к эксклюзионной хроматографии. UPLC относится к сверхэффективной жидкостной хроматографии. Подходящие колонки для SE, которые можно использовать в системе UPLC для характеристики таких ВМ соединений слитых белков рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта или конберцепта) в составе, способны разделять молекулы в диапазоне молекулярных масс около 10000-450000 Да. См., например, колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200A. В варианте осуществления изобретения две из таких колонок соединены последовательно при количественном определении ВМ соединений в составе. В UPLC улучшена чувствительность и разрешение по сравнению с HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографией). В UPLC используются приборы, которые работают при высоком давлении и используют более мелкие частицы (как правило, менее чем около 2,5 мкм), чем те, которые используются в HPLC. Более того, подвижные фазы UPLC работают при более высоких линейных скоростях, чем HPLC.

Варианты осуществления в данном документе включают составы, которые имеют высокую концентрацию (например, около 60 мг/мл, около 80 мг/мл, около 90 мг/мл, около 100 мг/мл, около 113,3 мг/мл, около 114,3 мг/мл, около 120 мг/мл, около 133,3 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 200

мг/мл или около 250 мг/мл) слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта или конберцепта). Подходящие составы, включенные в данный документ, имеют высокую концентрацию слитого белка рецептора ФРЭС, буфер, термостабилизатор и поверхностно-активное вещество. В некоторых аспектах подходящий состав дополнительно содержит снижающий вязкость агент. В других аспектах подходящий состав по существу исключает все снижающие вязкость агенты. Типичные составы имеют рН от около 5,0 до около 6,8 (например, 5,8), но могут иметь любой рН, подходящий для введения слитого белка рецептора ФРЭС в глаз субъекта.

Данное изобретение включает составы, которые содержат слитый белок рецептора ФРЭС (например, афлиберцепт или конберцепт) в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами (например, ингибитором Ang-2 (например, антителом против ANG2 или его антигенсвязывающим фрагментом или несвакумабом), активатором рецептора Tie-2, анти-PDGF, антителом против рецептора PDGF или рецептора-бета PDGF или его антигенсвязывающим фрагментом и/или дополнительным антагонистом ФРЭС, таким как бевацизумаб, ранибизумаб, пегаптаниб, или растворимой формой рецептора-3 фактора роста эндотелия сосудов человека (VEGFR-3), содержащий внеклеточные домены 1-3, экспрессируемые как Fc-слитый белок), а также способы профилактики или лечения, включающие введение таких составов, как обсуждается в данном документе. В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению содержит слитый белок рецептора ФРЭС, такой как афлиберцепт, но исключает любой дополнительный терапевтический агент (например, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент).

Термин "в сочетании с" указывает на то, что состав и дополнительный терапевтический агент могут быть составлены в единую композицию, например, для одновременной доставки, или составлены отдельно в две или более композиции (например, набор). Дополнительный терапевтический агент может быть составлен в виде его собственного фармацевтического состава. Каждый из них можно вводить субъекту одновременно с другим или в другое время, чем когда вводят другого; например, каждое введение можно проводить не одновременно (например, отдельно или последовательно) с интервалами в течение заданного периода времени. Более того, состав и дополнительный терапевтический агент можно вводить субъекту тем же или другим путем.

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению содержит один или более из следующих компонентов: натрий сульфат (например, 50 мМ); натрий тиоцианат (например, 50 мМ); натрий цитрат (например, 40 мМ); глицин (например, 50 мМ); натрий хлорид (например, 50 мМ); лизин (например, 50 мМ); натрий аспартат (например, 50 мМ); и/или натрий глутамат (например, 50 мМ). Например, в варианте осуществления композиция содержит комбинацию натрия цитрата (например, 50 мМ) и аргинин гидрохлорида (например, 50 мМ); глицин (например, 50 мМ) и аргинин гидрохлорида (например, 50 мМ); натрий аспартата (например, 50 мМ) и аргинин гидрохлорида (например, 50 мМ); или натрий глутамата (например, 50 мМ) и аргинин гидрохлорида (например, 50 мМ).

Слитые белки рецептора ФРЭС и другие ингибиторы ФРЭС

Для целей в данном документе "слитый белок рецептора ФРЭС" относится к молекуле, которая содержит один или более рецепторов ФРЭС или их доменов, слитых с другим полипептидом, который препятствует взаимодействию между ФРЭС и природным рецептором ФРЭС, например, где два из таких слитых полипептидов связываются, образуя гомодимер или другой мультимер. Такие слитые белки рецептора ФРЭС могут называться "ловушка ФРЭС" или "VEGF Trap". Слитые белки рецептора ФРЭС в контексте данного описания, подпадающие под это определение, включают химерные полипептиды, которые содержат два или более иммуноглобулин (Ig)-подобных домена рецептора ФРЭС, например VEGFR1 (также известный как Flt1) и/или VEGFR2 (также известный как Flk1 или KDR), а также может содержать мультимеризующий домен (например, Fc-домен).

Иллюстративный слитый белок рецептора ФРЭС представляет собой молекулу, называемую VEGF1R2-FcΔC1(a), которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1 или ее нуклеотидами 79-1374 или 79-1371.

VEGF1R2-FcΔC1(a) состоит из трех компонентов:

- (1) компонента VEGFR1, содержащего аминокислоты 27-129 из SEQ ID NO: 2;
- (2) компонента VEGFR2, содержащего аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; а также
- (3) мультимеризующего компонента ("FcΔC1(a)"), содержащего аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2 (С-концевые аминокислоты SEQ ID NO: 2, т.е. K458, могут быть включены или не включены в слитые белки рецептора ФРЭС, см. патент США № 7396664 или 7354579, включенные в данный документ для всех целей). Обратите внимание, что аминокислоты 1-26 из SEQ ID NO: 2 представляют собой сигнальную последовательность.

В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС содержит аминокислоты 27-458 или 27-457 из SEQ ID NO: 2.

В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС содержит:

- (1) иммуноглобулиноподобный (Ig) домен 2 первого рецептора ФРЭС (например, VEGFR1) и
- (2) домен 3 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2),

(3) и, необязательно, дополнительно содержит домен 4 Ig второго рецептора ФРЭС (например, VEGFR2) и

(4) мультимеризующий компонент (например, Fc-домен IgG).

Например, в варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС имеет следующее расположение указанных доменов:

[домен 2 Ig VEGFR1] - [домен 3 Ig VEGFR2] - [MC] (например, его гомодимер) или

[Домен 2 Ig VEGFR1] - [домен 3 Ig VEGFR2] - [домен 4 Ig VEGFR2] - [MC] (например, его гомодимер).

В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС представляет собой мини-ловушку ФРЭС, которая представляет собой молекулу-ловушку ФРЭС с усеченным мультимеризующим компонентом (например, Fc), например, в которой мини-ловушка все еще содержит шарнирную область Fc. См., например, WO2005/00895 или патент США № 7396664.

Следует отметить, что данное описание также включает в свой объем составы с высокой концентрацией, содержащие, вместо слитых белков рецептора ФРЭС, молекулы, связывающие ФРЭС, и антитела против ФРЭС и их антигенсвязывающие фрагменты, бевацизумаб (например, в концентрации около 80-90 или 88 мг/мл), ранибизумаб (например, в концентрации около 20-40 мг/мл, например, 21-35, 21 или 35 мг/мл), аптамер против ФРЭС, такой как пегаптаниб (например, пегаптаниб натрия), однопочечное (например, V_L-V_H) антитело против ФРЭС, такое как брлолицизумаб (например, в a-*-*-*----- концентрации около 200-400 или 200, 210, 400 или 420 мг/мл),

DARPin против ФРЭС, такой как абиципар пегол DARPin (например, в концентрации около 70-140, 70 или 140 мг/мл), или

биспецифическое антитело против ФРЭС, например, которое также связывается с ANG2, такое как RG7716 (например, в концентрации около 100-400, 100, 105, 400 или 420 мг/мл).

Чтобы свести к минимуму повторяемость вариантов осуществления, обсуждаемых в данном документе, предполагается, что объем данного изобретения включает варианты осуществления, в которых любой из составов, обсуждаемых в данном документе, содержит вместо слитого белка рецептора ФРЭС, антитело против ФРЭС или фрагмент антитела, или другую молекулу, связывающую ФРЭС, как обсуждается в данном документе (например, замещенную DARPin против ФРЭС) в любой из обсуждаемых в данном документе концентраций. Например, данное изобретение включает состав, содержащий 35 или 80 мг/мл ранибизумаба, буфер, термостабилизатор, снижающий вязкость агент и поверхностно-активное вещество.

DARPin представляют собой сконструированные белки с анкириновым повтором. DARPin, как правило, содержат от трех до четырех плотно упакованных повторов из приблизительно 33 аминокислотных остатков, каждый из которых содержит β-поворот и две антипараллельные α-спирали. Этот жесткий каркас обеспечивает стабильность белка, одновременно обеспечивая представление переменных областей, как правило, содержащих шесть аминокислотных остатков на повтор, для распознавания мишени.

Антитело "против ФРЭС" или антигенсвязывающий фрагмент антитела относится к антителу или фрагменту, которые специфически связываются с ФРЭС.

Иллюстративные слитые белки рецептора ФРЭС включают афлиберцепт (Эйлеа®, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) или конберцепт (коммерчески продаваемый Chengdu Kanghong Biotechnology Co., Ltd.). См. публикацию международной патентной заявки № WO 2005/121176 или WO 2007/112675. Термины "афлиберцепт" и "конберцепт" включают их биоподобные версии. Биоподобная версия эталонного продукта (например, афлиберцепт), как правило, относится к продукту, содержащему идентичную аминокислотную последовательность, но включает продукты, являющиеся биоподобными в соответствии с Законом США о ценовой конкуренции и инновациях в биопрепаратах.

Фармацевтические составы согласно данному изобретению имеют "высокую концентрацию". Фармацевтические составы с высокой концентрацией согласно данному изобретению содержат слитый белок рецептора ФРЭС в концентрации по меньшей мере 41 мг/мл, по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл, по меньшей мере 125 мг/мл, по меньшей мере 140 мг/мл, по меньшей мере 150 мг/мл, по меньшей мере 175 мг/мл, по меньшей мере 200 мг/мл, по меньшей мере 225 мг/мл, по меньшей мере 250 мг/мл или по меньшей мере 275 мг/мл. Альтернативно, "высокая концентрация" может относиться к составам, которые содержат концентрацию слитого белка рецептора ФРЭС от около 140 до около 160 мг/мл, по меньшей мере около 140 мг/мл, но менее чем 160 мг/мл, от около 41 до около 275 мг/мл, от около 70 до около 75 мг/мл или от около 80 до около 250 мг/мл. В некоторых аспектах концентрация слитого белка рецептора ФРЭС в составе составляет около любой из следующих концентраций: 41 мг/мл; 42 мг/мл; 43 мг/мл; 44 мг/мл; 45 мг/мл; 46 мг/мл; 47 мг/мл; 48 мг/мл; 49 мг/мл; 50 мг/мл; 51 мг/мл; 52 мг/мл; 53 мг/мл; 54 мг/мл; 55 мг/мл; 56 мг/мл; 57 мг/мл; 58 мг/мл; 59 мг/мл; 60 мг/мл; 61 мг/мл; 62 мг/мл; 63 мг/мл; 64 мг/мл; 65 мг/мл; 66 мг/мл; 67 мг/мл; 68 мг/мл; 69 мг/мл; 70 мг/мл; 71 мг/мл; 72 мг/мл; 73 мг/мл; 74 мг/мл; 75 мг/мл; 76 мг/мл; 77 мг/мл; 78 мг/мл; 79 мг/мл; 80 мг/мл; 81 мг/мл; 82 мг/мл; 83 мг/мл; 84 мг/мл; 85 мг/мл; 86 мг/мл; 87 мг/мл; 88 мг/мл; 89 мг/мл; 90 мг/мл; 91 мг/мл; 92 мг/мл; 93 мг/мл; 94 мг/мл; 95 мг/мл; 96 мг/мл; 97 мг/мл; 98 мг/мл; 99 мг/мл; 100 мг/мл; 101 мг/мл; 102 мг/мл; 103 мг/мл;

104 мг/мл; 105 мг/мл; 106 мг/мл; 107 мг/мл; 108 мг/мл; 109 мг/мл; 110 мг/мл; 111 мг/мл; 112 мг/мл; 113 мг/мл; 113,3 мг/мл; 114 мг/мл; 114,1 мг/мл; 114,2 мг/мл; 114,3 мг/мл; 114,4 мг/мл; 114,5 мг/мл; 114,6 мг/мл; 114,7 мг/мл; 114,8 мг/мл; 114,9 мг/мл; 115 мг/мл; 116 мг/мл; 117 мг/мл; 118 мг/мл; 119 мг/мл; 120 мг/мл; 121 мг/мл; 122 мг/мл; 123 мг/мл; 124 мг/мл; 125 мг/мл; 126 мг/мл; 127 мг/мл; 128 мг/мл; 129 мг/мл; 130 мг/мл; 131 мг/мл; 132 мг/мл; 133 мг/мл; 133,3 мг/мл; 133,4 мг/мл; 134 мг/мл; 135 мг/мл; 136 мг/мл; 137 мг/мл; 138 мг/мл; 139 мг/мл; 140 мг/мл; 141 мг/мл; 142 мг/мл; 143 мг/мл; 144 мг/мл; 145 мг/мл; 146 мг/мл; 147 мг/мл; 148 мг/мл; 149 мг/мл; 150 мг/мл; 151 мг/мл; 152 мг/мл; 153 мг/мл; 154 мг/мл; 155 мг/мл; 156 мг/мл; 157 мг/мл; 158 мг/мл; 159 мг/мл; 160 мг/мл; 161 мг/мл; 162 мг/мл; 163 мг/мл; 164 мг/мл; 165 мг/мл; 166 мг/мл; 167 мг/мл; 168 мг/мл; 169 мг/мл; 170 мг/мл; 171 мг/мл; 172 мг/мл; 173 мг/мл; 174 мг/мл; 175 мг/мл; 176 мг/мл; 177 мг/мл; 178 мг/мл; 179 мг/мл; 180 мг/мл; 181 мг/мл; 182 мг/мл; 183 мг/мл; 184 мг/мл; 185 мг/мл; 186 мг/мл; 187 мг/мл; 188 мг/мл; 189 мг/мл; 190 мг/мл; 191 мг/мл; 192 мг/мл; 193 мг/мл; 194 мг/мл; 195 мг/мл; 196 мг/мл; 197 мг/мл; 198 мг/мл; 199 мг/мл; 200 мг/мл; 201 мг/мл; 202 мг/мл; 203 мг/мл; 204 мг/мл; 205 мг/мл; 206 мг/мл; 207 мг/мл; 208 мг/мл; 209 мг/мл; 210 мг/мл; 211 мг/мл; 212 мг/мл; 213 мг/мл; 214 мг/мл; 215 мг/мл; 216 мг/мл; 217 мг/мл; 218 мг/мл; 219 мг/мл; 220 мг/мл; 221 мг/мл; 222 мг/мл; 223 мг/мл; 224 мг/мл; 225 мг/мл; 226 мг/мл; 227 мг/мл; 228 мг/мл; 229 мг/мл; 230 мг/мл; 231 мг/мл; 232 мг/мл; 233 мг/мл; 234 мг/мл; 235 мг/мл; 236 мг/мл; 237 мг/мл; 238 мг/мл; 239 мг/мл; 240 мг/мл; 241 мг/мл; 242 мг/мл; 243 мг/мл; 244 мг/мл; 245 мг/мл; 246 мг/мл; 247 мг/мл; 248 мг/мл; 249 мг/мл; 250 мг/мл; 251 мг/мл; 252 мг/мл; 253 мг/мл; 254 мг/мл; 255 мг/мл; 256 мг/мл; 257 мг/мл; 258 мг/мл; 259 мг/мл; 260 мг/мл; 261 мг/мл; 262 мг/мл; 263 мг/мл; 264 мг/мл; 265 мг/мл; 266 мг/мл; 267 мг/мл; 268 мг/мл; 269 мг/мл; 270 мг/мл; 271 мг/мл; 272 мг/мл; 273 мг/мл; 274 мг/мл или 275 мг/мл. В данном документе рассматриваются другие концентрации слитого белка рецептора ФРЭС при условии, что эта концентрация действует в соответствии с вариантами осуществления в данном документе.

В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтический состав согласно данному изобретению имеет такую концентрацию, чтобы содержать около 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 мг слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), или количество такого белка в любой из его приемлемых доз, обсуждаемых в данном документе, в около 100 мкл или меньше, около 75 мкл или меньше или около 70 мкл или меньше, например, около 50 мкл; 51 мкл; 52 мкл; 53 мкл; 54 мкл; 55 мкл; 56 мкл; 57 мкл; 58 мкл; 59 мкл; 60 мкл; 61 мкл; 62 мкл; 63 мкл; 64 мкл; 65 мкл; 66 мкл; 67 мкл; 68 мкл; 69 мкл; 70 мкл; 71 мкл; 72 мкл; 73 мкл; 74 мкл; 75 мкл; 76 мкл; 77 мкл; 78 мкл; 79 мкл; 80 мкл; 81 мкл; 82 мкл; 83 мкл; 84 мкл; 85 мкл; 86 мкл; 87 мкл; 88 мкл; 89 мкл; 90 мкл; 91 мкл; 92 мкл; 93 мкл; 94 мкл; 95 мкл; 96 мкл; 97 мкл; 98 мкл; 99 мкл; или 100 мкл.

Данное изобретение включает любой из составов, приведенных в данном документе в разделе "Иллюстративные составы", но в которых концентрация слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) заменена концентрацией, которая указана в этом разделе ("Слитые белки рецептора ФРЭС и другие ингибиторы ФРЭС").

Буферы

Буферы для использования в данном документе относятся к растворам, которые устойчивы к изменению pH при использовании кислотно-основных конъюгатов. Буферы способны поддерживать pH в диапазоне от около 5,0 до около 6,8, более типично от около 5,8 до около 6,5 и наиболее типично от около 6,0 до около 6,5. В некоторых случаях pH композиции согласно данному изобретению составляет около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7 или около 6,8. Примеры буферов для включения в составы в данном документе включают буферы на основе гистидина, например, гистидин, гистидин гидрохлорид гистидина и гистидин ацетат. Буферы для включения в составы в данном документе могут альтернативно быть буферами на основе фосфата, например, натрий фосфата, буферами на основе ацетата, например, натрий ацетата или уксусной кислоты, или могут быть буферами на основе цитрата, например, натрий цитрата или лимонной кислоты. Также известно, что буферы могут быть смесью вышеперечисленного, если буфер действуют как буфер для составов в вышеописанных диапазонах pH. В некоторых случаях концентрация буфера составляет от около 5 до около 25 mM или, более типично, от около 5 до около 15 mM. Концентрация буферов может составлять около 5 mM, около 6 mM, около 7 mM, около 8 mM, около 9 mM, около 10 mM, около 11 mM, около 12 mM, около 13 mM, около 14 mM, около 15 mM, около 16 mM, около 17 mM, около 18 mM, около 19 mM, около 20 mM, около 21 mM, около 22 mM, около 23 mM, около 24 mM или около 25 mM.

В варианте изобретения буфер на основе гистидина получают с использованием гистидина и моногидрохлорид гистидина.

Поверхностно-активные вещества

Поверхностно-активное вещество для применения в данном документе относится к ингредиентам, которые защищают более высокую концентрацию слитого белка рецептора ФРЭС от различных поверхностных и межфазных стрессов. Как таковые, поверхностно-активные вещества могут применяться для ограничения или минимизации агрегации слитого белка рецептора ФРЭС и повышения растворимости белка. Было показано, что подходящие поверхностно-активные вещества в данном документе неионные и могут включать поверхностно-активные вещества, которые имеют полиоксиэтиленовый фраг-

мент. Примеры поверхностно-активных веществ в этой категории включают полисорбат 20, полисорбат 80, полоксамер 188, полиэтиленгликоль 3350 и их смеси. Поверхностно-активные вещества в составах могут присутствовать в количестве от около 0,02 до около 0,1% массы на объем (мас./об.) и более типично от около 0,02 до около 0,04% (мас./об.). В некоторых случаях концентрация поверхностно-активного вещества составляет около 0,02% (мас./об.), около 0,03% (мас./об.), около 0,04% (мас./об.), около 0,05% (мас./об.), около 0,06% (мас./об.), около 0,07% (мас./об.), около 0,08% (мас./об.), около 0,09% (мас./об.) или около 0,1% (мас./об.).

Термостабилизаторы

Термостабилизаторы для применения в данном документе относятся к ингредиентам, которые обеспечивают термостабильность против тепловой денатурации слитого белка рецептора ФРЭС, а также защищают от потери эффективности или активности слитого белка рецептора ФРЭС. Подходящие термостабилизаторы включают сахара и могут представлять собой сахарозу, трегалозу, сорбитол или маннит или могут представлять собой аминокислоты, например L-пролин, L-аргинин (например, L-аргинин моногидрохлорид) или таурин. Кроме того, термостабилизаторы также могут включать замещенные акриламида или пропансульфоновою кислоту или могут представлять собой соединения, подобные глицерину.

В некоторых случаях представленные в данном документе составы включают как сахар, так и таурин, сахар и аминокислоту, сахар и пропансульфоновою кислоту, сахар и таурин, глицерин и таурин, глицерин и пропансульфоновою кислоту, аминокислоту и таурин или аминокислоту и пропансульфоновою кислоту. Кроме того, составы могут включать сахар, таурин и пропансульфоновою кислоту, глицерин, таурин и пропансульфоновою кислоту, а также L-пролин, таурин и пропансульфоновою кислоту.

В вариантах осуществления данного изобретения, как правило, термостабилизаторы присутствуют по отдельности, каждый независимо присутствует в концентрации или присутствует в комбинации в общей концентрации от около 2% (мас./об.) до около 10% (мас./об.) или от 4% (мас./об.) до около 10% (мас./об.), или от около 4% (мас./об.) до около 9% (мас./об.), или от около 5% (мас./об.) до около 8% (мас./об.). Термостабилизаторы в составе могут иметь концентрацию около 2% (мас./об.), около 2,5% (мас./об.), около 3% (мас./об.), около 4% (мас./об.), около 5% (мас./об.), около 6% (мас./об.), около 7% (мас./об.), около 8% (мас./об.), около 9% (мас./об.), около 10% (мас./об.) или около 20% (мас./об.).

Что касается таурина и пропансульфоновою кислоты, в варианте осуществления изобретения эти термостабилизаторы могут присутствовать в составах в концентрациях от около 25 до около 100 мМ, и более типично от около 50 до около 75 мМ (по сравнению с другими термостабилизаторами).

Снижающие вязкость агенты

Снижающие вязкость агенты, как правило, используются для уменьшения или предотвращения агрегации белка. Снижающие вязкость агенты для включения в данном документе включают: натрий хлорид, магний хлорид, D- или L-аргинин (например, L-аргинин моногидрохлорид), лизин или их смеси. Когда они присутствуют в данном документе, снижающие вязкость агенты могут присутствовать в количестве от около 10 до около 100 мМ и более типично от около 30 до около 75 мМ, и даже более типично от около 40 мМ до около 70 мМ. В некоторых случаях снижающий вязкость агент присутствует в количестве около 10 мМ, около 15 мМ, около 20 мМ, около 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ, около 50 мМ, около 55 мМ, около 60 мМ, около 65 мМ, около 70 мМ, около 75 мМ, около 80 мМ, около 85 мМ, около 90 мМ, около 95 мМ или около 100 мМ.

Вязкость состава

Составы в соответствии с вариантами осуществления, описанными в данном документе, также могут иметь фармацевтически приемлемую вязкость для окулярного введения, например, для интравитреальной инъекции. Вязкость, как правило, относится к мере сопротивления жидкости, которая деформируется или напряжением сдвига, либо растягивающим напряжением (как правило, измеряется способами, известными в данной области техники, например, вискозиметром или реометром). Типичные вязкости составов в соответствии с вариантами осуществления в данном документе составляют от около 5,0 сП (сантипуаз) до около 15 сП, от около 11 сП до около 14 сП, от около 12 сП до около 15 сП или от около 11 сП до около 12 сП. Таким образом, вязкость состава в данном документе может составлять около 5,0 сП, около 6,0, около 7,1 сП, около 7,2 сП, около 7,3 сП, около 7,4 сП, около 7,5 сП, около 7,6 сП, около 10 сП, около 10,5 сП, около 11,0 сП, около 11,5 сП, около 12,0 сП, около 12,5 сП, около 13,0 сП, около 13,5 сП, около 14,0 сП, около 14,5 сП или около 15,0 сП (например, при измерении при 20°C).

Различные варианты осуществления в данном документе не требуют включения неорганической соли или другого снижающего вязкость агента для поддержания этих в высокой степени подходящих вязкостей. Как правило, для растворов с высокой концентрацией белков необходимы снижающие вязкость агенты, чтобы избежать агрегации белка и более высокой вязкости, что затрудняет интравитреальную инъекцию составов и снижает активность слитого белка рецептора ФРЭС. Таким образом, варианты осуществления в настоящем документе включают составы, которые практически не содержат или не содержат натрий хлорид (NaCl), магний хлорид (MgCl₂), D- или L-аргинин гидрохлорид, лизин или другой снижающий вязкость агент.

Осмоляльность состава

Осмоляльность представляет собой важнейшее свойство инъекционных составов. Желательно, чтобы продукты соответствовали физиологическим осмотическим условиям. Кроме того, осмоляльность подтверждает наличие растворимого содержимого в растворе. В одном из вариантов осуществления изобретения осмоляльность состава согласно данному изобретению меньше или равна около 506 ммоль/кг или от около 250 до около 506 ммоль/кг, например около 250, 260, 270, 280, 290, 299, 300, 310, 314, 315, 316, 324, 343, 346, 349, 369, 384, 403, 426, 430 или 506 ммоль/кг. В варианте осуществления изобретения осмоляльность ниже около 250 ммоль/кг.

Чистота и стабильность составов

Описанные в данном документе составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, стабильны при производстве и хранении. Термин "стабильный" в данном документе относится к составам, которые содержат белки рецептора ФРЭС, которые сохраняют как химическую, так и физическую стабильность в течение периода изготовления и хранения состава, например, которые поддерживают целостность и имеют минимальную деградацию, денатурацию или разворачивание. Стабильность белка рецептора ФРЭС может быть определена с использованием аналитических методов, доступных в данной области техники, при различных температурах и в течение разных периодов времени. В частности, химическая стабильность (эффективность) рецептора ФРЭС может быть определена с использованием различных биологических анализов (например, клеточная линия BAF/3 VEGFR1/EPOR используется для определения связывания ФРЭС₁₆₅ слитыми белками рецептора ФРЭС, описанными в данном документе), и физическая стабильность может быть определена с помощью анализа методом эксклюзионной хроматографии (SE), эксклюзионной хроматографии (SE) UPLC (сверхэффективной жидкостной хроматографии), внешнего вида, ОП, pH, образования отличающихся зарядом вариантов и скорости образования высокомолекулярных (ВМ) соединений. Стабильный слитый белок рецептора ФРЭС представляет собой белок, который демонстрирует ограниченное изменение в своей ОП, pH, образовании отличающихся зарядом вариантов и образовании ВМ соединений.

Используемый в данном документе термин "высокомолекулярное" (ВМ) соединение в отношении состава, содержащего данную ловушку ФРЭС (например, афлиберцепт), относится к любому соединению, полипептиду или полипептидному комплексу, в составе, которое элюируется из эксклюзионной колонки (например, SE-UPLC) перед (например, с более высокой молекулярной массой) полипептидом-ловушкой ФРЭС и/или его гомодимером. Процент ВМ соединений относится к проценту таких соединений по отношению к общему количеству полипептидов в композиции, например, согласно анализу методом SE-UPLC.

В варианте осуществления изобретения, как более подробно обсуждается в приведенных ниже Примерах, стабильные составы демонстрируют значительную активность и физическую стабильность слитого белка рецептора ФРЭС в течение периода до 12 месяцев, до 24 месяцев и/или до 36 месяцев, при хранении при температуре от около 2 до около 8°C.

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению представляет собой состав, который

примерно через 28 суток при температуре около 37°C имеет около 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 30, 35 или 37% (или 10-15%, или 15-20%, или 10-20%) увеличение высокомолекулярных соединений (например, при измерении с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 28 суток при температуре около 37°C имеет около 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22% (или 5-20%, или 5-10%, или 10-15%, или 15-20%) уменьшение основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 28 суток при температуре около 37°C имеет около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86 или 87% (или около 80-85%) или более белка в виде основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 28 суток при температуре около 37°C имеет около 1, 1,5 или 2% (или 1-2%) увеличение низкомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через один месяц при температуре около 37°C имеет около 16% увеличение высокомолекулярных соединений; и/или около 17% уменьшение основного соединения и/или около 0,5% или <1% увеличение низкомолекулярных соединений; и/или через около два месяца при температуре около 5°C имеет около 1% уменьшение основного соединения; и/или около 1% увеличение высокомолекулярных соединений; и/или отсутствие значительных или определяемых количеств низкомолекулярных (НМ) соединений; и/или через около 2 месяца при температуре около 5°C, имеет около 97% основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 12 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около 3-3,5% увеличение высокомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 12 месяцев при температуре около 2-8°C имеет менее чем около 1% или 1, 2, 3 или 4% (например, 1-4% или 3-4%) снижение основного соединения (например, как измеряется с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 12 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около 94 или 95% или более белка в виде основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 3 месяца при температуре около 2-8°C имеет около 1 или 2% увеличение высокомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 6 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около <1, 1 или 2% увеличение высокомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 5^{1/2} или 6 месяцев при температуре около 5°C имеет около 2,5, 3,0 или 3,5 (или около 2,5-3,5%) общего количества высокомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 6 месяцев при температуре около 2-8°C имеет менее чем около 1%, или 1, или 2% (или около 0,5-2% или 1-2%) уменьшение основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 6 месяцев при температуре около 2-8°C, имеет около 96, 97 или 98% (или 96-98%) или более белка в виде основного соединения (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 24 или 36 месяцев при температуре около 2-8°C, имеет менее чем около 5 или 6, или 7% (например, около 1,5, 2, 3, 4 или 5%) (или 1,5-5% или 1,5-2,5%) увеличение высокомолекулярных соединений; и/или имеет около 3,0, 3,25, 3,5, 4,0, 4,5 или 5% общего количества высокомолекулярных соединений; и/или около 2 или 3% (или 2-3%) основного соединения; и/или общее количество основного соединения около 95 или 96% или более (или 95-96%) (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 1 месяц при температуре около 37°C в составе содержится около 97, 98, 99 или 100% (или 97-100%) афлиберцепта, который может быть извлечен методом RP-HPLC;

сразу после получения и очистки содержит менее 1,5, 2, 2,5, 3,0 или 3,5% высокомолекулярных соединений (например, как измерено с помощью SE-UPLC или SEC);

примерно через 6 месяцев при температуре около 37°C, имеет по меньшей мере около 70 или 75% (например, 70-75%) афлиберцепта в качестве основного соединения/основного пика (например, как измерено с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) или изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра) (некислотные и неосновные соединения);

примерно через 36 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около 1 или 2% (или 1-2%) увеличение кислотных соединений (например, как измерено с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) или изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра);

примерно через 36 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около 1% или менее снижение основного соединения/основного пика (например, как измерено с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) или изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра);

примерно через 36 месяцев при температуре около 2-8°C имеет около 78-79% основного соединения/основного пика (например, как измерено с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF) или изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра) и/или

при интравитреальном введении млекопитающему, такому как человек, кролик или мышь (например, с ангиогенным заболеванием глаз, таким как влажная ВМД), не вызывает каких-либо нежелательных явлений, которые клинически отличаются от наблюдаемых для Эйлеа (например, когда Эйлеа вводят интравитреально в дозе 0,5 или 2,0 мг); или не вызывает клинически значимого воспаления в глазу, длительного повышения внутриглазного давления (ВГД), длительного повышения или снижения артериального давления и/или отслоения сетчатки.

Кроме того, в варианте осуществления изобретения слитые белки рецептора ФРЭС в высокой концентрации являются стабильными, поскольку они демонстрируют небольшое образование отличающихся зарядом кислотных вариантов или его отсутствие в процессе получения и хранения, например, небольшое образование отличающихся зарядом вариантов или его отсутствие, как было протестировано, например, с помощью изоэлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра.

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению содержит менее чем или около 8% низкомолекулярных (НМ) соединений.

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению содержит менее чем около 0,2, 0,4 или 0,5 ЕЭ (единиц эндотоксина)/мл эндотоксина;

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению по существу не содержит твердых частиц или твердых частиц размером около 1, 2, 5, 10, 25 или 50 мкм (или более).

В варианте осуществления изобретения, когда состав согласно данному изобретению анализируется с помощью КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях (капиллярный электрофорез в присутствии доде-

цилсульфата натрия), по меньшей мере 97% общей площади пика является основным пиком.

В варианте осуществления изобретения, когда состав согласно данному изобретению анализируется с помощью эксклюзионной UPLC (SE-UPLC), по меньшей мере 93, 94 или 95% общей площади пика составляет основной пик и меньше или равно 3,5, 4, 5 или 6% является агрегатом.

В варианте осуществления изобретения состав согласно данному изобретению хранится при около 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C или 8°C, 2-8°C (например, средняя температура 5°C), 23°C, 25°C, 30°C или 37°C.

Иллюстративные составы

Иллюстративные составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС в высокой концентрации, включают следующее:

Состав А: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав В: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав С: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав D: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН 6,2.

Состав Е: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав F: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав G: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав H: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав I: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав J: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 80, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав K: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 80, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав L: 80 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 80, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав M: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав N: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав O: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав P: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН 6,2.

Состав Q: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав R: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 80 и 40 мМ натрий хлорида, с рН от 5,8 до 6,2.

Состав S: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав T: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2 (например, 6,2), и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

Состав U: 150 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе цитрата, 8% (мас./об.) сахарозы и 0,03% (мас./об.) полисорбата 20, с рН от 5,8 до 6,2, и, необязательно, специально исключая снижающий вязкость агент.

мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав VVV: 30 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 20% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав WWW: 60 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 10% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав XXX: 60 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 20% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав YYY: 120 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 10% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав ZZZ: 120 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 20% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2.

Состав AAAA: 120 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 10% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ NaCl, рН 6,2.

Состав BBBB: 120 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 20% сахарозы, 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ NaCl, рН 6,2.

Состав CCCC: 140 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 10 мМ натрий фосфата, 5% сахарозы, 40 мМ натрий хлорида, 0,03% PS20, рН 6,2.

Состав DDDD: 80 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта), 20 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида, с рН 5,8.

Состав EEEE: 120,0 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, ± 12 мг/мл), 20 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 2 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1).

Состав FFFF: 113,3 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, 102-125 мг/мл), 20 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 2 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1).

Состав GGGG: 114,3 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, 103-126 мг/мл), 10 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 1 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1).

Состав HHHH: 100,0 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, ± 10 мг/мл), 20 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 2 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1).

Состав IIII: 133,3 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, ± 13 мг/мл), 20 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 2 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1).

Состав JJJJ: 150 мг/мл афлиберцепта (например, афлиберцепта) (например, ± 15 мг/мл), 10 мМ натрий фосфата, 8% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,8\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин гидрохлорида, рН 6,2 (например, 6,0-6,4 или 5,9-6,5).

Состав KKKK: 114,3 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, ± 14 мг/мл), 20 мМ буфера на основе гистидина (например, ± 2 мМ), 5% (мас./об.) сахарозы (например, $\pm 0,5\%$), 0,03% (мас./об.) полисорбата 20 (например, 0,02-0,04%) и 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида (например, ± 5 мМ), с рН 5,8 (например, 5,6-6,0 или 5,5-6,1); или любой состав, который приведен в данном документе.

В варианте осуществления изобретения концентрация любого компонента состава (например, всех компонентов), перечисленных выше (например, любого из составов А-КККК) или обсуждаемых в данном документе, составляет+около 3%, 5% или около 10% от конкретно указанной концентрации.

Способы производства

Варианты осуществления в данном документе включают способы производства фармацевтического состава согласно данному изобретению, содержащего слитый белок рецептора ФРЭС (например, любой из составов А-КККК, приведенных в данном документе), включающие объединение компонентов состава в единую композицию и, необязательно, введение состава в сосуд или устройство, например, флакон, или устройство для доставки, например, предварительно заполненный шприц. Составы, флаконы или устройства, которые являются продуктом таких способов, являются частью данного изобретения.

В варианте осуществления изобретения способ производства фармацевтического состава согласно данному изобретению, содержащего слитый белок рецептора ФРЭС (например, любой из составов А-

КККК, приведенных в данном документе), включает стадии культивирования клетки-хозяина (например, клетки яичника китайского хомячка), содержащую один или более полинуклеотидов, кодирующих слитый белок рецептора ФРЭС (например, афлиберцепт) в среде для культивирования и в условиях, при которых белок экспрессируется; и очистку белка от клетки-хозяина и/или среды для культивирования и объединение части белка с эксципиентами фармацевтического состава, как изложено в данном документе. Опять же, составы, флаконы или устройства, которые являются продуктом таких способов, являются частью данного изобретения.

В варианте осуществления изобретения определяют количество и тип слитого белка рецептора ФРЭС, необходимого в составе для получения его высокой концентрации и для его конечного применения. Такое же определение проводится в отношении количества и типа буфера, количества и типа поверхностно-активного вещества, количества и типа термостабилизатора, а также включения или конкретного исключения снижающего вязкость агента. Эти компоненты объединяют и смешивают, следя за тем, чтобы pH состава имело желаемое значение, например, от около 5,0 до около 6,8 (например, 5,8), и/или чтобы вязкость имела желаемое значение, например, около 6,0, 7,3, 11,5 или 12,0 сП при 20°C. В варианте осуществления изобретения составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС с высокой концентрацией, можно стерилизовать и хранить в стабильном состоянии, например до 24 или 36 месяцев при 2°C до 8°C (например, 5°C).

См., например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

Ангиогенные заболевания и злокачественное новообразование глаз

Фармацевтические составы согласно данному изобретению, содержащие слитые белки рецептора ФРЭС (например, любой из фармацевтических составов А-КККК), могут быть использованы для лечения или профилактики любого ангиогенного заболевания глаз путем введения терапевтически эффективного количества слитого белка рецептора ФРЭС в составе согласно данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, например, посредством интравитреальной инъекции. Ангиогенные заболевания глаз в данном документе относятся к любому заболеванию глаз, которое вызвано или связано с ростом или разрастанием кровеносных сосудов и/или пропотеванием кровеносных сосудов. Неограничивающие примеры ангиогенных заболеваний глаз, которые поддаются лечению или предотвращению с использованием описанных в данном документе составов и способов, включают

возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма),

макулярный отек,

макулярный отек после окклюзии вены сетчатки,

окклюзию вены сетчатки (ОВС),

окклюзию центральной вены сетчатки (ОЦВС),

окклюзию ветки вены сетчатки (ОВВС),

диабетический макулярный отек (ДМО),

хориоидальную неоваскуляризацию (ХНВ),

неоваскуляризацию радужной оболочки,

неоваскулярную глаукому,

послеоперационный фиброз при глаукоме,

пролиферативную витреоретинопатию (ПВР),

неоваскуляризацию на диске зрительного нерва,

неоваскуляризацию роговицы,

неоваскуляризацию сетчатки,

витреальную неоваскуляризацию,

паннус,

птеригиум,

сосудистую ретинопатию,

диабетические ретинопатии (например, непролиферативную диабетическую ретинопатию (например, характеризующаяся уровнем около 47 или 53 по шкале оценки тяжести диабетической ретинопатии (DRSS)) или пролиферативную диабетическую ретинопатию; например, у субъекта, который не страдает ДМО) и диабетическую ретинопатию у пациента с диабетическим макулярным отеком (ДМО).

Фармацевтические составы согласно данному изобретению, содержащие слитые белки рецептора ФРЭС (например, любой из фармацевтических составов А-КККК), могут быть использованы для лечения или профилактики любого злокачественного новообразования путем введения терапевтически эффективного количества слитого белка рецептора ФРЭС в составе согласно данному изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, например, путем внутримышечной, внутрипухоловой, подкожной или внут-

ривенной инъекции. Злокачественные новообразования включают те, где рост, пролиферация, выживаемость и/или метастазирование которых в определенной степени зависят от ангиогенеза. В варианте осуществления изобретения рак представляет собой рак прямой кишки, рак легкого, рак кожи, рак груди, рак мозга, рак желудка, рак почек, рак простаты, рак печени или рак поджелудочной железы.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает способы лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение терапевтически эффективного количества слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) (например, около 4, 6 или 8,0, 8,1, 8,4 или 8,5 мг), например, в фармацевтическом составе согласно данному изобретению, интраокулярно, например в стекловидное тело глаза субъекта. В варианте изобретения в оба глаза вводят слитый белок рецептора ФРЭС. В варианте осуществления изобретения терапевтически эффективные дозы слитого белка рецептора ФРЭС вводят примерно каждые 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 13 недель, 14 недель, 15 недель, 16 недель, 17 недель, 18 недель, 19 недель, 20 недель, 21, недели, 22 недели, 23 недели или 24 недели. В варианте осуществления изобретения такие способы лечения или профилактики применяются при отсутствии значительного повышения артериального давления (систолического и/или диастолического) и/или развития гипертонии (например, 1-й степени, 2-й степени или 3-й степени), и/или аномально высокого внутриглазного давления у субъекта. В варианте осуществления изобретения способ включает стадию, на которой после указанного введения следят за субъектом на предмет значительного повышения артериального давления (систолического и/или диастолического) и/или развития гипертонии (например, 1-й степени, 2-й степени или 3-й степени), и/или аномально высокого внутриглазного давления у субъекта.

Способы введения

Фармацевтические составы согласно данному изобретению, которые содержат слитый белок рецептора ФРЭС, можно вводить в соответствии с известными одобренными с медицинской точки зрения системами доставки. В вариантах осуществления данного изобретения эти системы доставки могут включать введение препаратов пациенту путем окулярной, интраокулярной, интрахориоидальной, интравитреальной или субконъюнктивальной инъекции. Альтернативно, фармацевтические составы согласно данному изобретению также можно вводить пациенту местными путями, например, с использованием глазных капель, глазных гелей, глазных мазей и т.п. Другие возможные пути доставки составов согласно данному изобретению включают внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный.

В варианте осуществления изобретения интравитреальная инъекция фармацевтического состава согласно данному изобретению включает стадию прокалывания глаза шприцем и иглой (например, инъекционной иглой 30-го калибра), содержащей состав, и инъекции состава (например, менее или равно около 100 мкл; около 40, 50, 55, 56, 57, 57,1, 58, 60, 70 или 75 мкл) в стекловидное тело глаза (например, с объемом, достаточным для доставки терапевтически эффективного количества слитого белка рецептора ФРЭС, например, около 4, 5, 6, 7, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 8,9, 9, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 мг слитого белка рецептора ФРЭС). Необязательно, способ включает стадии введения местного анестетика (например, пропаракаина, лидокаина или тетракаина), антибиотика (например, фторхинолона), антисептика (например, повидон-йода) и/или агента для расширения зрачков в глаз, в который вводится состав. В варианте осуществления изобретения перед инъекцией создается стерильное поле вокруг глаза, подлежащего инъекции. В варианте осуществления изобретения после интравитреальной инъекции у субъекта наблюдают за повышением внутриглазного давления и/или кровяного давления. В варианте осуществления изобретения другой глаз также вводится при помощи той же процедуры.

Количество слитого белка рецептора ФРЭС для введения

Каждая доза слитого белка рецептора ФРЭС в высокой концентрации для субъекта в течение курса лечения может содержать такое же или по существу такое же количество слитого белка. Альтернативно, количество любой одной дозы может быть различным или изменяться в течение курса лечения.

Эффективное или терапевтически эффективное количество слитого белка рецептора ФРЭС для лечения или профилактики злокачественного новообразования (например, которое опосредовано, по меньшей мере частично ангиогенезом) или ангиогенного заболевания глаз, относится к количеству слитого белка с рецептором ФРЭС, достаточному для того, чтобы вызвать регресс, стабилизацию или устранение злокачественного новообразования или ангиогенного заболевания глаз, например, путем регресса, стабилизации или устранения одного или более симптомов или признаков злокачественного новообразования или ангиогенного заболевания глаз согласно любой клинически определяемой степени, например, в отношении ангиогенного заболевания глаз, вызывая снижение или поддержание по шкале оценки тяжести диабетической ретинопатии (DRSS), улучшая или поддерживая зрение (например, в остроте зрения с максимальной коррекцией, например, измеренной по увеличению букв по шкале ETDRS), увеличивая или сохраняя поле зрения и/или уменьшая или поддерживая толщину центральной области сетчатки и, в отношении злокачественного новообразования, останавливая или вызывая регресс роста, выживаемости и/или метастазирования раковых клеток у субъекта. В варианте осуществления изобретения эффективное или терапевтически эффективное количество слитого белка рецептора ФРЭС для лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз составляет от около 0,5 до около 10 мг или от 0,5 до

около 20 мг на дозу, включая около 0,5 мг или более; или около 2 мг или более, например около 2,1 мг; 2,2 мг; 2,3 мг; 2,4 мг; 2,5 мг; 2,6 мг; 2,7 мг; 2,8 мг; 2,9 мг; 3,0 мг; 3,1 мг; 3,2 мг; 3,3 мг; 3,4 мг; 3,5 мг; 3,6 мг; 3,7 мг; 3,8 мг; 3,9 мг; 4,0 мг; 4,1 мг; 4,2 мг; 4,3 мг; 4,4 мг; 4,5 мг; 4,6 мг; 4,7 мг; 4,8 мг; 4,9 мг; 5,0 мг; 5,1 мг; 5,2 мг; 5,3 мг; 5,4 мг; 5,5 мг; 5,6 мг; 5,7 мг; 5,8 мг; 5,9 мг; 6,0 мг; 6,1 мг; 6,2 мг; 6,3 мг; 6,4 мг; 6,5 мг; 6,6 мг; 6,7 мг; 6,8 мг; 6,9 мг; 7,0 мг; 7,1 мг; 7,2 мг; 7,3 мг; 7,4 мг; 7,5 мг; 7,6 мг; 7,7 мг; 7,8 мг; 7,9 мг; 8,0 мг; 8,1 мг; 8,2 мг; 8,3 мг; 8,4 мг; 8,5 мг; 8,6 мг; 8,7 мг; 8,8 мг; 8,9 мг; 9 мг; 9,1 мг; 9,2 мг; 9,3 мг; 9,4 мг; 9,5 мг; 9,6 мг; 9,7 мг; 9,8 мг; 9,9 мг; 10,0 мг; 10,1 мг; 10,2 мг; 10,3 мг; 10,4 мг; 10,5 мг; 10,6 мг; 10,7 мг; 10,8 мг; 10,9 мг; 11 мг; 11,1 мг; 11,2 мг; 11,3 мг; 11,4 мг; 11,5 мг; 11,6 мг; 11,7 мг; 11,8 мг; 11,9 мг; 12 мг; 12,1 мг; 12,2 мг; 12,3 мг; 12,4 мг; 12,5 мг; 12,6 мг; 12,7 мг; 12,8 мг; 12,9 мг; 13 мг; 13,1 мг; 13,2 мг; 13,3 мг; 13,4 мг; 13,5 мг; 13,6 мг; 13,7 мг; 13,8 мг; 13,9 мг; 14 мг; 14,1 мг; 14,2 мг; 14,3 мг; 14,4 мг; 14,5 мг; 14,6 мг; 14,7 мг; 14,8 мг; 14,9 мг; 15 мг; 15,1 мг; 15,2 мг; 15,3 мг; 15,4 мг; 15,5 мг; 15,6 мг; 15,7 мг; 15,8 мг; 15,9 мг; 16 мг; 16,1 мг; 16,2 мг; 16,3 мг; 16,4 мг; 16,5 мг; 16,6 мг; 16,7 мг; 16,8 мг; 16,9 мг; 17 мг; 17,1 мг; 17,2 мг; 17,3 мг; 17,4 мг; 17,5 мг; 17,6 мг; 17,7 мг; 17,8 мг; 17,9 мг; 18 мг; 18,1 мг; 18,2 мг; 18,3 мг; 18,4 мг; 18,5 мг; 18,6 мг; 18,7 мг; 18,8 мг; 18,9 мг; 19 мг; 19,1 мг; 19,2 мг; 19,3 мг; 19,4 мг; 19,5 мг; 19,6 мг; 19,7 мг; 19,8 мг; 19,9 мг или 20 мг. В варианте осуществления изобретения эффективное или терапевтически эффективное количество слитого белка рецептора ФРЭС для лечения или профилактики злокачественного новообразования составляет около 4 мг/кг (например, внутривенно). Эту дозу можно вводить, например, каждые 2 недели.

В варианте осуществления изобретения слитый белок рецептора ФРЭС вводят в объеме, достаточном для доставки желаемой дозы слитого белка, например, как описано выше. В варианте осуществления изобретения доставленный объем (например, для лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз, например, путем интравитреальной инъекции) меньше или равен около 100 микролитрам (например, примерно любой из следующих объемов: 25 мкл; 26 мкл; 27 мкл; 28 мкл; 29 мкл; 30 мкл; 31 мкл; 32 мкл; 33 мкл; 34 мкл; 35 мкл; 36 мкл; 37 мкл; 38 мкл; 39 мкл; 40 мкл; 41 мкл; 42 мкл; 43 мкл; 44 мкл; 45 мкл; 46 мкл; 47 мкл; 48 мкл; 49 мкл; 50 мкл; 51 мкл; 52 мкл; 53 мкл; 54 мкл; 55 мкл; 56 мкл; 57 мкл; 58; 59 мкл; 60 мкл; 61 мкл; 62 мкл; 63 мкл; 64 мкл; 65 мкл; 66 мкл; 67 мкл; 68 мкл; 69 мкл; 70 мкл; 71 мкл; 72 мкл; 73 мкл; 74 мкл; 75 мкл; 76 мкл; 77 мкл; 78 мкл; 79 мкл; 80 мкл; 81 мкл; 82 мкл; 83 мкл; 84 мкл; 85 мкл; 86 мкл; 87 мкл; 88 мкл; 89 мкл; 90 мкл; 91 мкл; 92 мкл; 93 мкл; 94 мкл; 95 мкл; 96 мкл; 97 мкл; 98 мкл или 99 мкл).

В варианте осуществления изобретения состав вводят (например, для лечения или профилактики ангиогенного заболевания глаз, например, посредством интравитреальной инъекции) в объеме, который составляет около 60 мкл или менее, около 70 мкл или менее, или около 75 мкл или менее, или около 100 мкл или менее. Например, в варианте осуществления изобретения около 2, 4, 6, 8,0, 8,1, 8,0-8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 8,9, 9,0 или 10 мг слитого белка рецептора ФРЭС вводят в около 50, 60, 70 или 75 мкл.

Объем данного изобретения также включает способы доставки 0,5 или 2 мг слитого белка рецептора ФРЭС (например, для лечения или предотвращения ангиогенного заболевания глаз, например, путем интравитреальной инъекции) в фармацевтическом составе согласно данному изобретению в небольшом объеме, например, в менее 50 мкл (например, в около 1, 5, 10, 17, 17,5, 18, 18,5, 20, 30, 40 или 45 мкл).

Данное изобретение также включает композицию, содержащую или состоящую или состоящую по существу из "объема однократной дозы" фармацевтического состава согласно данному изобретению, то есть объема, содержащего однократную дозу слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта) в фармацевтическом составе согласно данному изобретению (например, около 50 мкл или 60 мкл, 70 мкл или 75 мкл или любого другого объема, который содержит около 4, 6, 8 или 10 мг слитого белка рецептора ФРЭС). Как обсуждается ниже, контейнер (например, флакон или устройство для инъекции), содержащий объем однократной дозы, необязательно включающий небольшой избыточный объем состава, также является частью данного изобретения.

Контейнеры и устройства для инъекции

Составы слитого белка рецептора ФРЭС в высокой концентрации в соответствии с вариантами осуществления в данном документе (например, любой из составов А-КККК) могут быть предварительно упакованы или загружены в различные подходящие контейнеры и устройства для инъекций. Таким образом, данное изобретение включает контейнеры и устройства для инъекций, содержащие такие составы. В варианте осуществления в данном документе контейнер представляет собой флакон, который может быть стерильным. В другом варианте осуществления в данном документе контейнер представляет собой пробирку, которая может быть стерильной. В варианте осуществления изобретения устройство для инъекции (которое может быть стерильным) представляет собой шприц (например, предварительно заполненный шприц или шприц-ручку). В варианте осуществления изобретения устройство для инъекции представляет собой интравитреальный имплант, например, интравитреальный имплантат многоразового использования.

"Предварительно заполненный" шприц представляет собой шприц, который заполняется составом согласно данному изобретению перед продажей или использованием врачом или пациентом.

"Стерильный" в данном документе относится к асептическим или свободным от практически всех

или всех живых микроорганизмов и их спор.

Используемые в данном документе шприцы содержат цилиндры, сделанные, например, из стекла или полимера, например, из циклоолефина, как описано в публикации патента США № 2017/0232199, включенной в данный документ для всех целей, поршень и иглу.

Контейнеры и устройства для инъекций могут быть покрыты силиконом (например, силиконовым маслом или запеченным силиконом (например, ≤ 40 мкг или ≤ 100 мкг)).

В варианте осуществления изобретения контейнер или устройство для инъекции по существу не содержат металла или по существу не содержат вольфрама или содержат немного вольфрама.

В варианте осуществления изобретения шприц имеет одну или более линий градуировки и/или представляет собой систему измерения дозы.

Контейнеры в соответствии с вариантами осуществления изобретения могут содержать составы слитого белка рецептора ФРЭС в высокой концентрации. В некоторых аспектах контейнер или устройство для инъекции может включать этикетку с указанием показаний к применению. В некоторых случаях контейнер или устройство для инъекции может содержать листки-вкладыши в упаковке с инструкциями по применению, как описано в данном описании.

В других вариантах осуществления объем, содержащий одну дозу или более доз (например, 2 или более 2) слитого белка рецептора ФРЭС в высокой концентрации (например, в котором доза составляет 2 мг, 4 мг, 6 мг, 8 или 10 мг слитого белка рецептора ФРЭС), как описано выше, могут быть предварительно упакованы в контейнер или устройство для инъекции, например, стерильный шприц, для хранения до применения. В одном примере объем в контейнере содержит однократную дозу слитого белка рецептора ФРЭС, необязательно, дополнительно включая небольшое количество избыточного объема. Стерильные, предварительно заполненные шприцы могут быть сохранены в условиях хранения (например, $2-8^{\circ}\text{C}$), например, до 12 месяцев, 24 месяцев или 36 месяцев. Избыток представляет собой избыточный объем, который должен быть достаточным для изъятия и/или введения надлежащего объема. В варианте осуществления изобретения контейнер имеет объем однократной дозы или объемы многократных доз и около 5-10% избыточного объема.

Размеры шприца могут составлять, например, 0,3 куб.см, 0,5 куб.см или 1 куб.см. Стерильные шприцы, как правило, содержат иглу, пригодную для окулярной инъекции, как правило, длиной около 1/2 дюйма или от 12,5 до 16 мм, и могут быть 29-го калибра, 30-го калибра, 31-го калибра, 32-го калибра или 33-го калибра в зависимости от предпочтений пациента и специалиста здравоохранения. Могут использоваться иглы другой длины и калибра, если игла эффективна для выполнения интравитреальной инъекции.

Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на ряд вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что изменения в форме и деталях могут быть внесены в различные варианты осуществления, описанные в данном документе, без отклонения от сущности и объема изобретения и что различные варианты осуществления, описанные в данном документе, не предназначены для ограничения объема формулы изобретения.

Дополнительные составы

Данное изобретение включает следующие составы, содержащие более 40 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (например, афлиберцепта или конберцепта) и:

(a) буфер, содержащий соль гистидина (например, гистидин-HCl или гистидин-ацетат, например, от 10 мМ до 50 мМ) и имеющий pH в диапазоне от 5,7 до 6,2; сахар (например, более 6%, но не более 10%), такой как сахароза, трегалоза, маннит или глюкоза; поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полисорбата 20 и полисорбата 80 (например, от 0 до 0,1%);

(b) буфер, содержащий гистидин, такой как L-гистидин/гистидин гидрохлорид (например, 10 мМ); неионное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 20 (например, 0,03%), неорганическую соль, такую как NaCl (например, 40 мМ), и углевод, такой как сахароза (например, 5%), например, pH 6,0-6,5 (например, 6,2 или 6,5);

(c) лимонную кислоту (например, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ или 30 мМ), сахарозу (например, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10%), аргинин (например, 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ или 100 мМ) и полисорбат 20 (например, 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09% или 0,10%);

(d) буфер, такой как фосфат, гистидин, ацетат, сукцинат, цитрат, глутамат и/или лактат (например, 5-20 или 5-50 мМ); неионное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат (например, PS20 или PS80), додециловый эфир полиэтиленгликоля, полоксамер, 4-(1,1,3-тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль, алкилсахарид или алкилгликозид, тонирующий агент, например, полиол или аминокислоту, например, сахарозу, трегалозу, сорбит, маннит, глицерин, пролин, аргинин, метионин, глицин или лизин, при этом конечную осмоляльность состава составляет около 300 мОсм/кг, и где концентрация хлорид-аниона составляет менее чем около 10 мМ; pH 5,0-6,5; или

(e) 10 мМ натрий фосфата, 40 мМ натрий хлорида, 0,03% полисорбата 20 и 5% сахарозы, pH 6,2.

Примеры

Следующие ниже примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел, однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Любые составы, представленные в этих примерах, являются частью данного изобретения.

В этих примерах, когда эксперимент проводится при 2-8°C, заданная температура составляет 5°C с допуском отклонения +3°C.

Пример 1. Составы слитого белка рецептора ФРЭС в концентрации 80 мг/мл сохраняют эффективность, физическую стабильность и заряд в течение 36-месячного периода.

Серии из четырех различных составов, содержащих 80 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС (афлиберцепта), тестировали на предмет долгосрочной эффективности, физической стабильности и образования отличающихся зарядом вариантов. Перечень ингредиентов каждого из четырех составов приведен в табл. 1-1. Каждый состав оценивали на образование ВМ соединений слитого белка рецептора ФРЭС в процессе хранения при 2-8°C в течение 36 месяцев, а также определяли процент основного соединения методом SE-UPLC. Каждый состав, содержащий слитый белок рецептора ФРЭС, также оценивали с помощью изoeлектрического фокусирования с постоянным детектированием по всей длине капилляра в течение того же времени и температуры. Наконец, эффективность каждого состава была проверена при помощи биологического анализа в течение одного и того же времени и температуры.

Таблица 1-1. Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС

Состав	VEGFT (мг/мл)	Натрий фосфат (мМ)	Гистидин (мМ)	Сахароза (мас./об.)	Полисорбат 20 (мас./об.)	Натрий хлорид (мМ)	pH
F1 (B)	80	10	Н/Д	5	0,03	40	6,2
F2 (H)	80	10	Н/Д	8	0,03	0	6,2
F3 (D)	80	Н/Д	10	5	0,03	40	6,2
F4 (G)	80	Н/Д	10	8	0,03	0	6,2

Таблица 1-2. % ВМ соединений

	Состав	Состав	Состав	Состав
	B	H	D	G
	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4
Месяцы при 2-8C				
0.0	1.7	1.6	1.6	1.3
1	2.1	2.1	1.6	1.7
2.0	2.3	2.2	1.8	1.8
3.0	2.4	2.5	2.0	2.1
6.0	2.9	2.8	2.0	2.3
9.0	3.1	3.0	2.2	2.4
12.0	2.8	3.0		2.4
18.0	3.2	3.2	2.6	2.5
24.0	3.6	3.6	3.1	2.8
36.0	4.2	4.2	3.2	3.2

Таблица 1-3. % основного пика

	Состав	Состав	Состав	Состав
	B	H	D	G
	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4
Месяцы при 2-8C				
0.0	98.4	98.4	98.4	98.8
1	97.9	98.0	98.4	98.3
2.0	97.7	97.8	98.2	98.2
3.0	97.7	97.5	98.0	98.0
6.0	97.1	97.2	97.9	97.7
9.0	96.9	97.0	97.8	97.6
12.0	97.2	97.0		97.4
18.0	96.8	96.8	97.4	97.5
24.0	96.5	96.4	96.8	97.2
36.0	95.7	95.7	96.8	96.8

Таблица 1-4. % кислотных соединений

	Состав B	Состав H	Состав D	Состав G
	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4
Месяцы при 2-8С				
0.0	15.8	15.1	16.0	15.2
12	15.6	15.9	NP	16.0
24.0	16.0	17.1	16.2	16.9
36.0	16.9	17.4	17.2	17.6

Таблица 1-5. % основного соединения

	Состав B	Состав H	Состав D	Состав G
	Состав 1	Состав 2	Состав 3	Состав 4
Месяцы при 2-8С				
0.0	78.9	79.1	79.2	79.9
12	79.3	79.3	NP	79.7
24.0	79.3	78.5	79.5	79.3
36.0	78.6	78.1	78.7	78.6

Данные представлены на фиг. 1A, 1B, 1C и 1D. На фиг. 1A показан процент ВМ соединений слитого белка рецептора ФРЭС, образованных в каждом из четырех составов. Для ловушки ФРЭС показана немного более медленная скорость образования ВМ соединений, если состав основан на гистидине, по сравнению с составом, основанным на натрий-фосфате. Как показано на фиг. 1A, % ВМ соединений после хранения при 2-8°C в течение 36 месяцев увеличился на 2,6% в составах с натрий-фосфатом (составы 1 и 2) по сравнению с увеличением на 1,6-1,9% в гистидиновых буферах (составы 3 и 4). Данные были подтверждены, как показано на фиг. 1B, где SE-UPLC использовали для определения процента основного соединения слитого белка рецептора ФРЭС, присутствующих в тех же временных рамках и температурном диапазоне. В качестве точки сравнения анализы проводились с текущим составом Эйлеа® (40 мг/мл), содержащим 10 мМ натрий-фосфата, который продемонстрировал увеличение на 1,2% содержания ВМ соединений после хранения при 2-8°C в течение 36 месяцев (не показано). Кроме того, каждый из четырех составов ловушки ФРЭС с концентрацией 80 мг/мл тестировали на эффективность и сравнивали с активностью Эйлеа® (не показано). Эффективность контролировали с помощью биологического анализа для всех четырех составов, а также для Эйлеа®. Эти данные демонстрируют, что составы согласно данному изобретению способны поддерживать стабильность слитого белка рецептора ФРЭС, сравнимую с Эйлеа®.

Ссылаясь на фиг. 1C и 1D, процент отличающихся зарядом вариантов ловушки ФРЭС, образованных после хранения при 2-8°C в течение 36 месяцев также был протестирован. На фиг. 1C показано, что ловушка ФРЭС в составах 1-4 не продемонстрировала значимого изменения процентного содержания кислотных соединений в течение 36 месяцев, а на фиг. 1D показаны те же результаты для процента основного соединения в течение 36 месяцев. Обнаружение того, что ловушка ФРЭС, сохраняющая отличающиеся зарядом варианты соединений во время хранения, демонстрируют, что качество ловушки ФРЭС сохранялось, а такие процессы, как дезаминирование, образование N-концевого пироглутамата, изомеризация, агрегация и т.д. не происходили в течение хранения.

Данные в примере 1 демонстрируют, что составы с удвоенной концентрацией ловушки ФРЭС, обнаруженной в Эйлеа®, могут сохранять физическую стабильность, качество и эффективность в течение 36 месяцев при 2-8°C. Кроме того, хотя все четыре состава продемонстрировали аналогичную эффективность в течение периода, составы, содержащие гистидин, приводили к несколько меньшему увеличению образования ВМ соединений (признак деградации белка), демонстрируя, что при некоторых обстоятельствах гистидин может быть предпочтительным буфером. Однако результаты для буферов на основе гистидина и фосфата продемонстрировали отличную стабильность в ходе исследования.

Пример 2. Стабильность 150 мг/мл ловушки ФРЭС в составах с натрий-фосфатным буфером/сахарозой.

Два состава с натрий фосфатом были протестированы на физическую стабильность 150 мг/мл ловушки ФРЭС (афлиберцепта) при 37°C в течение 28 суток. Перечень ингредиентов каждого из двух составов приведен в табл. 2-1. Каждый состав оценивали на предмет образования ВМ соединений в процессе хранения при 37°C в течение 28 суток, а также определяли процент основного соединения методом SE-UPLC.

Таблица 2-1. Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС (афлиберцепта), для примера 2

Состав	VEGFT (мг/мл)	Натрий фосфат (мМ)	Сахароза (мас./об.)	Полисорбат 20 (мас./об.)	Аргинин-НCl (мМ)	pH
F1 (T)	150	10	8%	0,03	Н/Д	6,2
F2 (JJJ)	150	10	8%	0,03	50	6,2

Таблица 2-2. % ВМ соединений

	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, pH 6,2	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида, pH 6,2
	Фосфат	Фосфат-аргинин
Суток при 37С		
0.0	2.4	1.9
7	6.4	6.1
14.0	8.4	8.3
21.0	10.4	10.5
28.0	12.2	12.5

Таблица 2-3. % основного пика

	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, pH 6,2	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида, pH 6,2
	Фосфат	Фосфат-аргинин
Суток при 37С		
0.0	97.6	98.1
7	93.6	93.9
14.0	91.0	91.1
21.0	88.9	89.0
28.0	87.1	86.9

На фиг. 2А показан, что не было значимой разницы в % ВМ соединениях, образованных между двумя составами во время хранения при 37°C в течение 28 суток, что подтверждается процентным соотношением основного соединения с помощью SE-UPLC (фиг. 2В). Не было изменений внешнего вида, мутности или pH у двух составов в течение 28 суток (не показано).

Затем результаты сравнивали с составами, которые содержали 40 мг/мл Эйлеа® и составом 1 из примера 1 (80 мг/мл ловушки ФРЭС в натрий-фосфатном буфере). Как и ожидалось, составы с 150 мг/мл ловушки ФРЭС продемонстрировали более высокий процент образования ВМ соединений по сравнению с составом Эйлеа® и несколько более высокий процент образования ВМ соединений по сравнению с составом 1 из примера 1.

Дальнейшие тесты, проведенные на составах, содержащих высокую концентрацию ловушки ФРЭС, и составах, содержащих гистидин, показали лучшую защиту этих молекул, чем составы на основе натрий фосфата. Кроме того, включение натрий хлорида в каждый из тестируемых составов фактически вызвало дестабилизацию ловушки ФРЭС при 37°C. Данные в примере 2 демонстрируют, что даже при высоких концентрациях 150 мг/мл слитого белка рецептора ФРЭС и при хранении при довольно экстремальных температурах представленные в данном документе составы обеспечивают превосходную защиту в отношении физической стабильности.

Пример 3. Фармацевтически приемлемая вязкость состава может быть достигнута для 150 мг/мл ловушки ФРЭС.

Ряд составов, содержащих ловушку ФРЭС (афлиберцепт), тестировали на их вязкость. Составы, содержащие от 10 до 160 мг/мл ловушки ФРЭС, тестировали в присутствии и в отсутствие различных снижающих вязкость агентов.

На фиг. 3А показаны составы, содержащие 155 мг/мл ловушки ФРЭС в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, 5% сахарозе и pH 6,2 в комбинации без неорганической соли, с аргинином, лизином, натрий хлоридом и магний хлоридом, продемонстрировавшие небольшую разницу в вязкости. В каждом случае вязкость измеряли в сП при 20°C. Наблюдали диапазон вязкости от около 17 сП (без неорганической соли) до 15 сП (100 мМ магний хлорида) с небольшими вариациями между тем, какой снижающий вязкость агент использовали, или в присутствии снижающего вязкость агента вообще. На фиг. 3В показана

аналогичная серия составов, за исключением того, что основной буфер имеет 10 мМ гистидина и pH 5,8. Здесь отсутствие какой-либо неорганической соли обеспечило состав с вязкостью 11,5 сП, а 50 мМ лизина обеспечило состав с вязкостью 14 сП. Буфер, содержащий гистидин, обеспечивает отличную вязкость, которая соответствует свойствам других впрыскиваемых биологических препаратов с низкой концентрацией.

На фиг. 3С показана вязкость ловушки ФРЭС между концентрациями 10 и 160 мг/мл, с 10 мМ натрий-фосфатом, 5% сахарозой при pH 6,2 в отсутствие аргинина и в 50 мМ аргинин гидрохлорида. Включение снижающего вязкость агента привело к аналогичным значениям вязкости для всех протестированных концентраций ловушек ФРЭС. Как показано на фиг. 3А и 3В, снижающий вязкость агент оказывал незначительное положительное влияние на вязкость состава даже при более высоких концентрациях белка. Это неожиданный результат, поскольку ранее было показано, что аргинин и другие снижающие вязкость агенты обладают полезными свойствами в отношении вязкости белка при высокой концентрации.

Таблица 3-1. Вязкость-составы с фосфатом (сП при 20°C)

Состав буфера	10 мМ натрий фосфата, 5% сахарозы, pH 6,2
Без понизителя вязкости	17,3
100 мМ аргинина	16,2
200 мМ аргинина	15,8
50 мМ лизина	16,2
100 мМ натрий хлорида	16,5
50 мМ магний хлорида	16,3
100 мМ магний хлорида	15,3

Таблица 3-2. Вязкость-составы с гистидином (сП при 20°C)

Состав буфера	10 мМ гистидина, pH 5,8
Без понизителя вязкости	11,5
100 мМ аргинина	12,0
200 мМ аргинина	12,7
50 мМ лизина	14,0
200 мМ лизина	14,1
50 мМ натрий хлорида	13,1
100 мМ натрий хлорида	12,1
50 мМ магний хлорида	12,6
100 мМ магний хлорида	11,4

Пример 4. Аргинин гидрохлорид улучшает стабильность 150 мг/мл ловушки ФРЭС в составах с натрий-фосфатным буфером/сахарозой.

Два состава с натрий фосфатом были протестированы в отношении физической стабильности 150 мг/мл ловушки ФРЭС (афлиберцепта) при 2-8°C в течение 12 месяцев. Перечень ингредиентов каждого из двух составов представлен в табл. 4-1. Состав 2 дополнительно содержит 50 мМ аргинин гидрохлорида. Каждую композицию оценивали на предмет образования ВМ соединений в процессе хранения при 37°C в течение 12 месяцев, а также определяли процент основного соединения методом SE-UPLC.

Таблица 4-1. Составы, содержащие слитый белок рецептора ФРЭС (афлиберцепт), для примера 3

Состав	VEGFT (мг/мл)	Натрий фосфат (мМ)	Сахароза (мас./об.)	Полисорбат 20 (мас./об.)	pH	Аргинин гидрохлорид (мМ)
F1 (T)	150	10	8%	0,03	6,2	0
F2 (JJJ)	150	10	8%	0,03	6,2	50

На фиг. 4А показано, что включение в состав 50 мМ аргинин гидрохлорида улучшило физическую стабильность ловушки ФРЭС. Этот стабилизирующий атрибут ловушки ФРЭС был подтвержден на фиг. 4В, где процент основного соединения остается выше для ловушки ФРЭС в присутствии 50 мМ аргинин гидрохлорида. Эти данные демонстрирует, что существуют ситуации, при которых добавление аргинин гидрохлорида обеспечивает стабилизирующий эффект на хранимую ловушку ФРЭС. Табличные данные эксклюзионной хроматографии представлены в табл. 4-2 и 4-3.

Таблица 4-2. % ВМ соединений

	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида, рН 6,2
Месяцы при 2-8С		
0.0	2.4	1.9
1	3.3	2.8
2.0	3.8	3.2
3.0	4.1	3.5
6.0	4.9	4.1
9.0	5.5	4.7
12.0	5.9	5.0

Таблица 4-3. % основного пика

	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, рН 6,2	10 мМ натрий фосфата, 8% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ L-аргинин моногидрохлорида, рН 6,2
Месяцы при 2-8С		
0.0	97.6	98.1
1	96.8	97.2
2.0	96.2	96.8
3.0	95.9	96.5
6.0	95.1	95.8
9.0	94.5	95.3
12.0	94.1	94.5

Пример 5. Вязкость 10 мг/мл-170 мг/мл ловушки ФРЭС в гистидиновом и фосфатном буферах

На фиг. 5 показано, что 10 мМ фосфатный буфер и 10 мМ гистидиновый буфер имеют в высокой степени подходящие вязкости для диапазона концентраций ловушки ФРЭС (афлиберцепта). При более высоких концентрациях ловушки ФРЭС гистидиновый буфер продемонстрировал улучшение вязкости (по сравнению с фосфатом). Вязкость измеряли при 20°C.

Пример 6. Таурин и пропансульфоновая кислота обеспечивают улучшенную стабильность для составов с высокой концентрацией ловушки ФРЭС (афлиберцепта).

Был проведен эксперимент для определения влияния на стабильность белка ряда комбинаций составов. На фиг. 6 показан график динамического светорассеяния для составов, содержащих от 2 мг/мл белка до 10 мг/мл белка (афлиберцепта). Составы, которые содержали 70 мМ таурина или 70 мМ PSA, продемонстрировали снижение самовзаимодействия при более высоких концентрациях. Эти данные указывают на то, что таурин и PSA могут быть полезными включениями в составы с высокой концентрацией белка, подобные тем, о которых идет речь в данном случае.

Пример 7. Долгосрочное исследование стабильности различных составов, содержащих гистидин.

Всего было протестировано 9 различных составов афлиберцепта с различной концентрацией буфера, термостабилизаторами и гидрофобными солями. 9 составов F1-F9 приведены ниже в табл. 7-1.

Таблица 7-1. Составы F1-F9.

Состав	VEG FT (мг/мл)	Тип буфера	Концентрация буфера (мМ)	Сахара за (% мас./об.)	Пролин (% мас./об.)	Полисорбат 20 (мас./об.)	Стабилизатор (мМ)	Концентрация стабилизатора (мМ)	рН
F1 (WW)	140	His	10	5	0	0,03	Таурин	50	5,8
F2 (XX)	140	His	20	0	4	0,03	Аргинин HCl	50	5,8

F3 (YY)	140	His	20	2,5	2	0,03	Таурин	50	5,8
F4 (ZZ)	140	His	10	2,5	2	0,03	Аргинин HCl	50	5,8
F5 (AAA)	140	His	20	5	0	0,03	PSA	50	5,8
F6 (BBB)	140	His	20	2,5	2	0,03	PSA	50	5,8
F7 (CCC)	140	His	20	5	0	0,03	Аргинин HCl	50	5,8
F8 (DDD)	140	His	10	0	4	0,03	PSA	50	5,8
F9 (EEE)	140	His	20	5	0	0,03	Н/Д	Н/Д	5,8

VEGFT=ловушка ФРЭС (афлиберцепт)

Четырнадцать (14) мл каждого состава смешивали в пробирках Falcon объемом 15 мл. Затем состав стерильно фильтровали с использованием 0,22 мкМ шприцевого фильтра и заполняли стерильные стеклянные флаконы типа 1 объемом 2 мл. Для каждого состава заполняли восемь (8) флаконов объемом 0,4 мл в вытяжном шкафу с ламинарным потоком.

SE-UPLC (молекулярные массы соединений) выполняли на всех образцах для определения химической стабильности каждого состава.

Процент ВМ соединений с течением времени для каждого из составов F1-F9 приведен на фиг. 7 (см. также табл. 7-2). Составы F4 и F7 показали самый низкий процент ВМ соединений после 4-х месяцев при 5°C. Результаты показали, что добавление эксципиентов, таких как аргинин и пролин, значительно снижает скорость образования в % ВМ соединений в составах с ловушкой ФРЭС.

Таблица 7-2. Анализ методом SE-UPLC (2-8°C)

Месяцы при 2-8С	F1 (WW)		F2 (XX)		F3 (YY)	
	% ВМ	% основног о пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика
0,0	1,53	98,46	1,48	98,52	1,39	98,61
0,5	1,87	98,13	1,87	98,13	1,92	98,08
1,0	2,19	97,81	2,16	97,84	2,19	96,15
2,0	2,64	97,36	2,63	97,37	2,71	97,29
3,0	2,83	97,17	2,76	97,24	2,87	97,13
4,0	3,07	96,93	3,00	97,00	3,11	96,89
5,0	3,24	96,76	3,11	96,89	3,28	96,72
6,0	3,35	96,65	3,24	96,76	3,38	96,62

F4 (ZZ)		F5 (AAA)		F6 (BBB)	
% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика
1,31	98,69	1,55	98,45	1,45	98,55
1,69	98,31	1,79	98,21	1,96	98,04
1,95	98,05	2,31	97,69	2,26	97,74
2,37	97,63	2,80	97,20	2,72	97,28
2,61	97,39	2,99	97,01	2,91	97,09
2,84	97,16	3,26	96,74	3,17	96,83
3,03	96,97	3,44	96,56	3,35	96,65
3,13	96,87	3,52	96,48	3,41	96,59

F7 (CCC)		F8 (DDD)		F9 (EEE)	
% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика
1,20	98,80	1,56	98,44	1,53	98,47
1,74	98,26	1,87	98,13	2,05	97,95
2,08	97,92	2,16	97,84	2,39	97,61
2,52	97,48	2,59	97,41	2,89	97,11
2,76	97,24	2,80	97,20	3,07	96,93
2,97	97,03	3,06	96,94	3,34	96,66
3,14	96,86	3,21	96,79	3,51	96,49
3,26	96,74	3,28	96,72	3,69	96,31

Пример 8. Исследование стабильности 140 мг/мл ловушки ФРЭС при различных концентрациях аргинина.

Было изучено влияние изменения концентрации аргинин HCl на стабильность четырех составов глазных лекарственных препаратов со 140 мг/мл ловушки ФРЭС (афлиберцепта). Оценку стабильности проводили при условиях хранения 2-8°C. Лекарственный препарат (ЛП) также инкубировали в условиях стресса (37°C). Четыре состава, оцениваемые в этом исследовании стабильности (F1-F4), описаны в табл. 8-1, представленной ниже.

Таблица 8-1. Составы F1-F4

Номер состава	Композиция					рН
	VEGFT (мг/мл)	Гистидин (мМ)	Сахароза (мас./об.)	Полисорбат 20	L- аргинин-	
F1	140	20	5	0.03	0	5.8
F2					10	
F3					50	
F4					100	

Приблизительно 145 мл гистидиновых составов со 187 мг/мл ловушки ФРЭС размораживали. Было приготовлено тридцать шесть (36) мл каждого состава, за исключением F3; приготовили 39 мл F3. Каждый состав стерилизовали фильтрованием в LFH (вытяжном шкафу с ламинарным потоком) с использованием 0,22 мкм стерилизующего фильтра Durapore PVDF перед заполнением. Чистые апирогенные стеклянные флаконы типа I объемом 2 мл от компании Schott, закрытые 13 мм инъекционными пробками (S2-F451 4432/50B2-40), использовали для проведения исследований стабильности.

Анализ составов методом SE-UPLC проводили, как изложено выше. Измерения % ВМ с использованием SE-UPLC в каждом составе с течением времени представлены на фиг. 8 (А-В). См. также таблицы 8-2 и 8-3.

При хранении при 5°C эти составы демонстрировали снижение скорости образования % ВМ соединений, которое было пропорционально концентрации аргинин HCl. Однако под воздействием стресса этот эффект был обращен вспять. Композиции при 37°C демонстрировали очевидное % увеличение ВМ соединений, пропорциональное концентрации аргинин HCl. Это свойство сделало открытие благоприятного воздействия аргинина на афлиберцепт в присутствии гистидинового буфера маловероятным. Как правило, для разработки составов в биотехнологической промышленности действие различных эксципентов на лекарственное средство сначала проверяется в условиях стресса (например, при повышенной

температуре, такой как 37°C) в течение короткого периода времени. Цель этого подхода состоит в том, чтобы быстро исключить эксципиенты, которые вряд ли будут хорошо работать в отсутствие стресса (например, при более низкой температуре, такой как 5°C) в течение более длительного периода времени. Здесь аргинин был идентифицирован как полезный эксципиент, несмотря на его влияние на стабильность при 37°C. Поскольку готовый лекарственный препарат после производства, как правило, хранится в течение нескольких месяцев при 4-5°C, афлиберцепт в аргининовом и гистидиновом буфере будет очень ценным составом для длительного стабильного хранения лекарственного препарата.

Таблица 8-2. Анализ методом SE-UPLC (2-8°C)

Месяцы при 2-8С	F1 (EEE)		F2 (SSS)	
	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
0,0	97,79	2,21	97,78	2,22
0,5	97,56	2,43	97,59	2,41
1,0	97,30	2,70	97,34	2,66
1,5	97,21	2,79	97,26	2,74
2,0	97,05	2,95	97,08	2,92
2,5	96,96	3,04	97,02	2,98
3,0	96,82	3,18	96,88	3,12
6,0	96,35	3,65	96,40	3,60

F3 (CCC)		F4 (TTT)	
% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
97,85	2,15	97,81	2,19
97,67	2,33	97,73	2,27
97,47	2,53	97,59	2,41
97,37	2,63	97,50	2,50
97,22	2,78	97,36	2,64
97,14	2,86	97,31	2,69
97,04	2,96	97,16	2,84
96,60	3,40	96,77	3,23

Таблица 8-3. Анализ методом SE-UPLC (37°C)

Сутки при 37С	F1 (EEE)		F2 (SSS)	
	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
0,0	97,79	2,21	97,78	2,22
7	93,66	6,34	93,32	6,68
14,0	89,48	10,35	88,79	10,98
21,0	86,64	13,08	85,69	13,82
28,0	83,90	15,85	82,66	16,90

F3 (CCC)		F4 (TTT)	
% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
97,85	2,15	97,81	2,19
92,38	7,61	91,32	8,68
86,90	12,91	84,61	15,21
83,11	16,65	80,11	19,47
79,44	20,29	75,80	23,91

Пример 9. Стабильность ловушки ФРЭС в присутствии противоионов из серии Хофмайстера и других эксципиентов.

Было определено влияние различных противоионов и других эксципиентов на стабильность нескольких составов.

А. Скрининг противоионов

Противоионы (например, сульфат, тиоцианат и цитрат) тестировали в форме натриевых солей с составами с высокой концентрацией ловушки ФРЭС (афлиберцепта) (140 мг/мл). Кроме того, также тестировали другие аминокислотные эксципиенты (например, глицин и лизин).

Приблизительно 42 мл 187 мг/мл лекарственной субстанции ловушки ФРЭС для глаз размораживали. Готовили 50 мл промежуточной лекарственной субстанции в лекарственной форме (155,56 мг/мл), имеющей 110% концентрацию 140 мг/мл лекарственного вещества в лекарственной форме и целевую концентрацию эксципиентов (исключая противоионы, глицин и лизин).

Лекарственная субстанция в промежуточной лекарственной форме была дополнительно разбавлена 0,5 М исходными растворами эксципиентов (противоионы, глицин или лизин) для получения составов лекарственной субстанции в лекарственной форме с концентрацией 140 мг/мл, перечисленных в табл. 9-1 ниже. Каждый конечный состав стерилизовали фильтрованием через 0,22 мкм шприцевый фильтр из ПВДФ в вытяжном шкафу с ламинарным потоком перед заполнением чистых апиrogenных стеклянных флаконов типа I объемом 2 мл от компании Schott, закрытых 13 мм инъекционными пробками S2-F451 4432/50 82-40 (артикул № 19700004 Wash № 0 000078949). Шестьдесят (60) флаконов были заполнены 0,5 мл каждого состава. Шесть (6) флаконов были заполнены 1,5 мл.

Таблица 9-1. Составы для скрининга противоионов

Эксципиент (мМ)	Состав	Конц. ловушки ФРЭС
Натрий сульфат, 50мМ	20мМ гистидин/ 0,03% PS20/5% сахарозы/ 50 мМ натрий сульфата	140
Натрий тиоцианат, 50 мМ	20 мМ гистидина/ 0,03%PS20/5% сахарозы/ 50 мМ натрий тиоцианата	140
Натрий цитрат, 50 мМ	20 мМ гистидина/ 0,03% PS20/ 5% сахарозы/ 50 мМ натрий цитрата	140
Глицин, 50 мМ	20 мМ гистидина/ 0,03%PS20/5% сахарозы/ 50 мМ глицина	140
Натрий хлорид, 50 мМ	20мМ гистидина/ 0,03% PS20/ 5% сахарозы/50 мМ натрий хлорида	140
Лизин, 50 мМ	20мМ гистидина /0,03% PS20% / 5% сахарозы /50 мМ лизина	140

В. Скрининг глутамата и аспартата

Была протестирована стабильность составов с высокой концентрацией ловушки ФРЭС (афлиберцепта) (140 мг/мл) в присутствии органических противоионов в комбинации с аргинин гидрохлоридом. Кроме того, два новых противоиона (глутамат и аспарат) были протестированы на совместимость с ловушкой ФРЭС в высокой концентрации (в комбинации и без аргинин гидрохлорида). Протестированные составы приведены ниже в табл. 9-2.

Приблизительно 50 мл 187 мг/мл лекарственной субстанции-ловушки ФРЭС размораживали. Изготавливали 60 мл лекарственной субстанции в промежуточной лекарственной форме (155,56 мг/мл) с использованием 110% 140 мг/мл лекарственной субстанции в лекарственной форме и целевой концентрации эксципиентов (исключая противоионы, цитрат, глицин, глутамат и аспарат). Лекарственную субстанцию в промежуточной лекарственной форме дополнительно разбавляли 1М исходными растворами эксципиентов (аргинин гидрохлорида, натрий цитрата, глицина, натрий глутамата и натрий аспартата) для получения составов лекарственной субстанции в лекарственной форме с концентрацией 140 мг/мл, перечисленных в таблице ниже. Каждый конечный состав стерилизовали фильтрованием через 0,22 мкм шприцевый фильтр из ПВДФ в вытяжном шкафу с ламинарным потоком перед заполнением чистых апиrogenных стеклянных флаконов типа I объемом 2 мл от компании Schott, закрытых 13 мм инъекционными пробками S2-F451 4432/50 B2-40 (артикул № 19700004 Wash № 0000078949). Шестьдесят (60) флаконов были заполнены 0,5 мл каждого состава. Шесть (6) флаконов были заполнены 1,5 мл.

Таблица 9-2. Составы для скрининга глутамата и аспартата

Экципиент (мМ)	Состав	Конц. ловушки ФРЭС
Натрий цитрат, 40 мМ+ аргинин гидрохлорид, 50 мМ	20 мМ гистидина/0,03% PS20/ 5% сахарозы /50 мМ натрий цитрата /50 мМ аргинин гидрохлорида	140
Глицин, 50 мМ+ аргинин гидрохлорид, 50 мМ	20 мМ гистидина/ 0,03% PS20/ 5% сахарозы/50 мМ глицина/50мМ аргинин гидрохлорида	140
Натрий аспартат, 50 мМ+ аргинин гидрохлорид, 50 мМ	20 мМ гистидина/ 0,03% PS20/5% сахарозы/50 мМ натрий аспартата/50 мМ аргинин гидрохлорида	140
Натрий глутамат, 50 мМ+ аргинин гидрохлорид, 50 мМ	20 мМ гистидина/0,03% PS20/5% сахарозы/50 мМ натрий глутамата/50 мМ аргинин гидрохлорида	140
Натрий аспартат, 50 мМ	20мМ гистидина/0,03% PS20/5% сахарозы/ 50 мМ натрий аспартата	140
Натрий, глутамат, 50 мМ	20 мМ гистидина/0,03% PS20/5% сахарозы/ 50 мМ натрий глутамата	140

Определение вязкости проводили с помощью вискозиметра RHEOSENSE m-VROC®. Примерно 0,5 мл неразбавленного образца загружали в стеклянный шприц. Образец уравнивали до желаемой температуры и вводили в чип или измерительную ячейку. Вязкость рассчитывали путем измерения перепада давления от входа к выходу, который коррелирует с напряжением сдвига на стенке чипа. Результаты выражаются как мПа·с или сП. См. фиг. 9 и табл. 9-3.

Определение осмоляльности проводили с использованием осмометра давления пара VAPRO. Примерно 10 мкл неразбавленного образца вносили на бумажный диск. Понижение температуры точки росы, зависящее от давления паров раствора, измеряли с помощью чувствительной терморпары и регистрировали как осмоляльность раствора. Результаты выражаются в ммоль/кг или мОсм. См. фиг. 10 и табл. 9-3.

Высокомолекулярные соединения в определенных составах с течением времени после хранения при 37°C или 5°C также оценивали при помощи SE-UPLC. См. фиг. 11 (A-B) и табл. 9-4 и 9-5.

Эксперименты по динамическому рассеянию света проводили с использованием DynaPro® Plate Reader II. Приблизительно 100 мкл неразбавленного образца загружали в 96-луночный планшет. Было получено тридцать пять измерений для каждой лунки при 25°C. Анализ автокорреляционной функции с использованием регуляризации был выполнен в программе DYNAMICS v7.1. Для получения среднего молекулярного радиуса и % значений полидисперсности (% Pd) для каждого образца были построены графики зависимости радиуса (нм) от % интенсивности и % массы от радиуса (нм). См. фиг. 12.

Таблица 9-3. Вязкость и осмоляльность различных составов

Протестированный параметр	50 мМ натрий сульфата (GGG)	50 мМ натрий тиоцианата (NNN)	40 мМ натрий цитрата (III)	50 мМ глицина (JJJ)	50 мМ натрий хлорида (KKK)	50 мМ лизина (LLL)
вязкость (сП)	11,9	12,4	14,8	12,2	11,6	11,8
Осмоляльность (мОсмоль/кг)	384	324	403	299	349	349

50 мМ натрий аспартата (MMM)	50 мМ натрий глутамата (NNN)	50 мМ натрий цитрата + 50 мМ аргинин HCl (OOO)	50 мМ глицина + 50 мМ аргинин HCl (PPP)	50 мМ натрий аспартата + 50 мМ аргинин-HCl (QQQ)	50 мМ натрий глутамата + 50 мМ аргинин HCl (RRR)
13,0	13,1	14,8	12,5	13,1	13,3
343	346	506	369	426	430

Таблица 9-4. Анализ методом SE-UPLC; % ВМ (37°C)

% ВМ (сутки при 37 °C)	50 мМ натрий сульфата (GGG)	50 мМ натрий тиоцианата (HHH)	40 мМ натрий цитрата (III)	50 мМ глицина (JJJ)	50 мМ натрий хлорида (KKK)	50 мМ лизина (LLL)
0	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2
7	8,6	15,5	8,2	6,3	8,1	7,7
14	13,5	24,8	12,1	9,5	12,4	11,7
28	22,0	39,2	19,1	15,3	20,4	19,3

Таблица 9-5. Анализ методом SE-UPLC; % ВМ (5°C)

% ВМ (месяцы при 5C)	50 мМ натрий сульфата (GGG)	50 мМ натрий тиоцианата (HHH)	40 мМ натрий цитрата (III)	50 мМ глицина (JJJ)	50 мМ натрий хлорида (KKK)	50 мМ лизина (LLL)
0	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,2
0,25	2,3	2,4	2,4	2,3	2,3	2,3
0,5	2,4	2,5	2,5	2,4	2,4	2,3
1	2,5	2,8	2,7	2,6	2,6	2,5
2	2,8	2,9	2,9	2,8	2,8	2,8
3	3,1	3,3	3,2	3,1	3,2	3,0

Пример 10. Переносимость интравитреальной доставки высокой дозы ловушки ФРЭС (140 мг/мл) у здоровых кроликов.

Терапевтические средства против ФРЭС, вводимые с помощью интравитреальной инъекции, в настоящее время являются стандартом лечения неоваскулярной возрастной дегенерации желтого пятна, диабетического макулярного отека и окклюзионных болезней сосудов сетчатки. Однако ежемесячные или двухмесячные интравитреальные инъекции представляют собой значительную нагрузку на пациентов, индивидуумов, осуществляющих лечение или уход, и врачей. В клинической практике существует острая потребность в более эффективных и пролонгированных препаратах. Это исследование предназначено для изучения переносимости высокой дозы ловушки ФРЭС в стабильной лекарственной форме (140 мг/мл, что эквивалентно 14-кратной клинической дозе) на глазах здорового новозеландского белого кролика.

Были протестированы два состава с высокой дозой ловушки ФРЭС (афлиберцепта) в гистидиновом буфере или в фосфатном буфере. Три кролика на когорту получали 7 мг ловушки ФРЭС в 50 мкл путем однократной билатеральной интравитреальной инъекции каждого состава. Признаки глазного воспаления контролировали с помощью щелевой лампы, оптической когерентной томографии (ОКТ) и ангиографа глазного дна на 1-е сутки, 4-е сутки, 1-ю неделю, а затем еженедельно до 12 недель после интравитреального введения. Внутриглазное давление измеряли с помощью Топореп до и через 10 и 30 мин после интравитреальной инъекции, а затем в каждую последующую временную точку. На 12 неделе животных умерщвляли.

В глаза кролика вводили:

(1) 140 мг/мл афлиберцепта, 20 мМ гистидина, 5% сахарозы, 50 мМ аргинин HCl, 0,03% PS20, pH 5,8;

или

(2) 140 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ натрий фосфата, 5% сахарозы, 40 мМ натрий хлорида, 0,03% PS20, pH 6,2.

Два из шести глаз из группы, получавшей гистидиновый буфер, продемонстрировали темные тени в стекловидном теле до 8 недель после IVT (интравитреальной инъекции), что было подтверждено обследованием с помощью щелевой лампы в виде местной катаракты из-за связанного с процедурой повреждения задней поверхности хрусталика. Один из 6 глаз, получавших фосфатный буфер, продемонстрировал темные тени в стекловидном теле до 8 недель после IVT, что было подтверждено обследованием с помощью щелевой лампы в виде местной катаракты из-за повреждения задней поверхности хрусталика (связанного с процедурой).

Глаза здорового новозеландского белого кролика в течение 12 недель после однократного интравитреального введения хорошо переносили протестированные составы с высокой дозой ловушки ФРЭС (140 мг/мл). После однократной интравитреальной инъекции 7 мг ловушки ФРЭС на глазном дне не наблюдали никаких признаков аномалий или воспаления. Стекловидное тело было прозрачным, а сосудистый рисунок сетчатки выглядел нормальным. Отслоения сетчатки, кровоизлияний или изменений диска зрительного нерва не наблюдали. Изменений внутриглазного давления по сравнению с исходным уровнем не было. Исходные изображения флуоресцентной ангиографии (ФАГ) и ОКТ глаз кроликов представлены на фиг. 13 (A-D). Временная серия изображений ФАГ и ОКТ глаз кроликов в каждой группе лечения в течение 8 недель представлены на фиг. 14, 15, 16 и 17. Показаны данные для левого глаза (OS) или правого глаза (OD) кроликов 326 и 329.

Пример 11. Оценка стабильности составов UUU-BBBB

В этом исследовании изучалась стабильность ловушки ФРЭС (афлиберцепта) в концентрации 60 и

120 мг/мл в 10 мМ фосфата, 10 или 20% сахарозы (сах.), 0 или 50 мМ NaCl, 0,03% полисорбата 20, pH 6,2, когда инкубируют при 37°C до 6 месяцев. Составы для этого исследования стабильности представлены ниже в табл. 11-1.

Таблица 11-1. Составы UUU-BBBB

Обозначение состава	[Ловушка ФРЭС], мг/мл	% сахарозы	мМ NaCl
F1 (UUU)	30	10	-
F2 (VVV)	30	20	-
F3 (WWW)	60	10	-
F4 (XXX)	60	20	-
F5 (YYY)	120	10	-
F6 (ZZZ)	120	20	-
F7 (AAAA)	120	10	50
F8 (BBBB)	120	20	50

Базовый состав: 10 мМ фосфата, 0,03% полисорбата 20, pH 6,2

Ловушка ФРЭС=афлиберцепт

Состав стерилизовали фильтрованием с 0,2 мкм фильтром из ПВДФ в вытяжном шкафу с ламинарным потоком перед распределением.

Флаконы, содержащие каждый состав, хранили при 37°C в течение 1 месяца.

Таблица 11-2. Результаты обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC)

Состав	Условия хранения	Фактическая инкубация (месяцы)	% извлеченного VEGFT	[VGFT] мг/мл
30 мг/мл 10% сахарозы (UUU)	37°C	0,0	100,0	29,99
		1,0	97,9	29,37
30 мг/мл 20% сахарозы (VVV)	37°C	0,0	100,0	29,97
		1,0	98,2	29,44
60 мг/мл 10% сахарозы (WWW)	37°C	0,0	100,0	58,90
		1,0	98,3	57,89
60 мг/мл 20% сахарозы (XXX)	37°C	0,0	100,0	58,80
		1,0	98,9	58,18
120 мг/мл 10% сахарозы (YYY)	37°C	0,0	100,0	120,80
		1,0	97,4	117,63
120 мг/мл 20% сахарозы (ZZZ)	37°C	0,0	100,0	117,85
		1,0	98,9	116,51
120 мг/мл 10% сахарозы 50 мМ NaCl (AAAA)	37°C	0,0	100,0	120,14
		1,0	97,9	117,64
120 мг/мл 20% сахарозы 50 мМ NaCl (BBBB)	37°C	0,0	100,0	120,55
		1,0	97,0	116,94

VGFT=ловушка ФРЭС, афлиберцепт

Таблица 11-3. Результаты эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC)

Состав	Условия хранения	Фактическая Инкубация (месяцы)	Всего % ВМ	% нативных	Всего % НМ
30 мг/мл VGFT 10% сахарозы (UUU)	37°C	0	0,8	99,0	0,1
		1,0	4,1	94,0	1,9
30 мг/мл VGFT 20% сахарозы (VVV)	37°C	0	0,8	99,0	0,2
		1,0	2,4	95,6	2,0
60 мг/мл VGFT 10% сахарозы (WWW)	37°C	0	1,0	98,8	0,2
		1,0	7,8	89,5	2,7
60 мг/мл VGFT 20% сахарозы (XXX)	37°C	0	1,0	98,8	0,2
		1,0	4,4	92,8	2,7
120 мг/мл VGFT 10% сахарозы (YYY)	37°C	0	1,3	98,5	0,2
		1,0	18,3	79,5	2,2
120 мг/мл VGFT 20% сахарозы (ZZZ)	37°C	0	1,2	98,5	0,2
		1,0	10,7	87,1	2,2
120 мг/мл VGFT 10% сахарозы 50 mM NaCl (AAAA)	37°C	0	1,3	98,5	0,2
		1,0	20,8	77,1	2,2
120 мг/мл VGFT 20% сахарозы 50 mM NaCl (BBBB)	37°C	0	1,2	98,5	0,3
		1,0	13,0	84,8	2,2

VGFT=ловушка ФРЭС, афлиберцепт

Все составы практически не содержали частиц при визуальном осмотре и измерении оптической плотности. Не было значительной потери белка при извлечении с помощью RP-HPLC через 1 месяц при 37°C (табл. 11-2), и эта тенденция продолжалась до 6 месяцев.

Основным путем деградации ловушки ФРЭС была агрегация в этих условиях (фиг. 18 (А-В); табл. 11-3). Стабильность ловушки ФРЭС зависела от концентраций белка и сахарозы. Составы с более низкими концентрациями ловушки ФРЭС и более высоким содержанием сахарозы были более стабильными. Сохранение того же соотношения белок: сахароза не привело к такой же скорости деградации. Например, F1 и F4 имеют одинаковое соотношение белок: сахароза 3:1, но F4 был менее стабильным, чем F1 из-за более высокой концентрации белка. Аналогичные тенденции наблюдались до 6 месяцев.

Пример 12. Токсикологическое исследование с многократным интравитреальным введением доз на обезьянах с различными составами афлиберцепта.

В этом примере оценивается безопасность различных составов на яванских макаках. Всего 7 интравитреальных доз вводят в оба глаза приблизительно один раз в 4 недели в группах 1-3; всего группам 4-9 вводят 3 интравитреальных дозы в оба глаза примерно один раз в 4 недели. Терминальную некропсию выполняют примерно через неделю после последней дозы (N=3/пол/группа) с некропсией на этапе восстановления после лечения (2/пол/группа) примерно через 12 недель после последней дозы.

Выполняются следующие оценки:

Оценка безопасности, основанная на клинических признаках, массе тела, жизненно важных функциях, данных электрокардиографии (до введения дозы, в конце лечения и в конце восстановления), изменения артериального давления (через хвостовую манжету), клинической и анатомической патологии

Комплексные осмотры глаз с регулярными интервалами в период введения доз и восстановления, включая микроскопию с помощью щелевой лампы, непрямой офтальмоскопии и измерения внутриглазного давления

Фотография, флуоресцентная ангиография и электроретинография глазного дна перед лечением, в течение 9-й недели исследования (все группы), 26-й недели (только группы 1-3) и в конце периода восстановления

Образцы крови и стекловидного тела (по завершению) для биоанализа, анализа на антитела против лекарственного вещества и токсикокинетической оценки

Таблица 13. Сводные данные по группам исследования*

Группа	Исследуемый материал	Объем интравитреальной дозы (мкл/доза/глаз)	мг афлиберцепта/глаз	N/пол	N/пол для терминальной некропсии	N/пол для восстановления
1	20 мМ гистидина, 50 мМ аргинина , 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	0 (контроль)	5	3	2
2	80 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ	50	4	5	3	2
	гистидина, 50 мМ аргинина , 5% сахарозы, 0,03% PS20					
3	~ 140 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ гистидина, 50 мМ аргинина , 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	~ 7	5	3	2
4	20 мМ гистидина, 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	0 (контроль)	5	3	2
5	80 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ гистидина, 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	4	5	3	2
6	~ 140 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ гистидина, 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	~ 7	5	3	2
7	20 мМ гистидина, 50 мМ глицина , 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	0 (контроль)	5	3	2
8	80 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ гистидина, 50 мМ глицина , 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	4	5	3	2
9	~ 140 мг/мл афлиберцепта в 20 мМ гистидина, 50 мМ глицина , 5% сахарозы, 0,03% PS20	50	~ 7	5	3	2

* каждый из указанных составов является частью данного изобретения

Ожидается, что составы, протестированные на любой одной или более из групп 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и/или 9, будут иметь профиль безопасности, сравнимый с Эйлеа у яванских макаков, как измерено в оценках, обсужденных выше.

Пример 13. Исследование стабильности препарата с ловушкой ФРЭС

Состав, содержащий 114,3 мг/мл ловушки ФРЭС (афлиберцепта) и 10 мМ гистидина, pH 5,8, 5% сахарозы, 0,03% полисорбата 20, 50 мМ аргинин моногидрохлорида, был приготовлен в LFH (вытяжном шкафу с ламинарным потоком) с использованием 0,22 мкм стерилизующего фильтра Durapore PVDF перед заполнением. Чистые апиrogenные стеклянные флаконы типа I объемом 3 мл от компании Schott заполняли 0,3 мл лекарственного препарата и закрывали 13 мм инъекционными пробками (S2-F451

4432/50B2-40). Образцы анализировали в различные моменты времени после хранения при 37°C или 5°C на предмет чистоты с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) для определения присутствия (%) высокомолекулярных (ВМ) соединений, низкомолекулярных (НМ) соединений и основного пика (главный); а также с помощью визуализация микропотоков, подсчета количества частиц в жидкости с использованием ИАС (путем светоблокировки) и микроскопического определения присутствия частиц различных размеров.

Данные о стабильности и чистоте после хранения при 37°C, 25°C и 2-8°C приведены на фиг. 19 (А-Е). См. также табл. 13-1-13-4.

Таблица 13-1. Анализ чистоты методом эксклюзионной хроматографии (SEC)

37 °C			
Месяцы	% основного пика	% ВМ	% НМ
0	98,23	1,77	0
0,229	92,88	7,07	0,05
0,459	88,59	11,18	0,23
0,688	84,67	15,03	0,3
0,918	81,84	17,59	0,57
5 °C			
Месяцы	% основного пика	% ВМ	% НМ
0	98,23	1,77	0
1	97,73	2,27	0
2	97,4	2,59	0

Таблица 13-2. Визуализация микропотоков/частицы, невидимые невооруженным глазом

37 °C					
Месяцы	≥1 мкм	≥2 мкм	≥5 мкм	≥10 мкм	≥25 мкм
T = 0	1125	234	42	9	0
28 суток	1128	184	17	0	0

Таблица 13-3. Твердые частицы, невидимые невооруженным глазом, измеренные методом светоблокировки (ИАС)/частицы, невидимые невооруженным глазом

37 °C			
Месяцы	≥10 мкм	≥25 мкм	≥50 мкм
T = 0	15	0	0
28 суток	23	1	1

Таблица 13-4. Микроскопический анализ частиц, невидимых невооруженным глазом

37 °C			
Месяцы	≥10 мкм	≥25 мкм	≥50 мкм
T = 0	8	1	1
28 суток	6	2	1

Пример 14. Исследование стабильности при различных концентрациях ловушки ФРЭС.

Было изучено влияние изменения концентрации ловушки ФРЭС на стабильность четырех составов глазных лекарственных препаратов с ловушкой ФРЭС (афлиберцептом). Концентрации варьировались от 80 до 140 мг/мл. Оценку стабильности проводили при условиях хранения 2-8°C. Лекарственный препарат (ЛП) также инкубировали в условиях стресса (37°C). Четыре состава (каждый из которых назван в данном документе "ССС"), оцениваемые в этом исследовании стабильности, описаны в табл. 14-1, представленной ниже.

Приблизительно 27 мл каждого состава было приготовлено в LFH (вытяжном шкафу с ламинарным потоком) с использованием 0,22 мкм стерилизующего фильтра Dugapore PVDF перед заполнением. Чистые апиrogenные стеклянные флаконы типа I объемом 2 мл от компании Schott заполняли и закрывали 13 мм инъекционными пробками (S2-F451 4432/50B2-40). Образцы были проанализированы в различные моменты времени после хранения при 37°C или 2-8°C на предмет чистоты с помощью эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UPLC) для определения присутствия (%) высокомолекулярных (ВМ) соединений и основного пика (главный).

Данные, демонстрирующие процентное содержание ВМ после инкубации при 2-8°C или 37°C в течение до 6 месяцев, представлены на фиг. 20 (А-В). См. также табл. 14-2 и 14-3. При хранении при 37°C и 5°C эти составы демонстрировали положительную корреляцию между скоростью образования ВМ и концентрацией ловушки ФРЭС. Состав с 140 мг/мл продемонстрировал наивысшую скорость в % образования ВМ соединений.

Таблица 14-1. Протестированные составы

Номер состава	композиция					
	L-аргинин, мМ	Гистидин (мМ)	Сахароза (мас./об.)	Полисорбат 20 (мас./об.)	VEGFT (мг/мл)	pH
F1 (CCC)	50	20	5	0,03	80	5,8
F2 (CCC)					100	
F3 (CCC)					120	
F4 (CCC)					140	

Таблица 14-2. Анализ методом SE-UPLC (2-8°C)

Месяцы при 2-8С	F1 (CCC): 80 мг/мл		F2 (CCC): 100 мг/мл		F4 (CCC): 120 мг/мл		F3 (CCC): 140 мг/мл	
	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
0,0	97,90	2,10	97,86	2,14	97,83	2,17	97,85	2,15
1	97,91	2,09	97,79	2,21	97,65	2,35	97,47	2,53
2,0	97,78	2,22	97,56	2,44	97,38	2,62	97,22	2,78
3,0	97,61	2,39	97,38	2,62	97,17	2,83	97,04	2,96
5,5	97,39	2,61	97,10	2,90	96,79	3,21		
6,0	97,36	2,64	97,04	2,96	96,74	3,26	96,60	3,40

Таблица 14-3. Анализ методом SE-UPLC (37°C)

Сутки при 37С	F1 (CCC): 80 мг/мл		F2 (CCC): 100 мг/мл		F4 (CCC): 120 мг/мл		F3 (CCC): 140 мг/мл	
	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ	% основного пика	% ВМ
0,0	97,90	2,10	97,86	2,14	97,83	2,17	97,85	2,15
7	94,83	5,15	93,82	6,17	92,81	7,18	92,38	7,61
14,0	92,00	7,77	90,31	9,39	88,67	11,13	86,90	12,91
21,0	89,47	10,31	87,00	12,58	85,04	14,85	83,11	16,65
28,0	86,76	12,71	83,98	15,55	81,19	18,46	79,44	20,29

Пример 15. Высокая доза Эйлеа имеет увеличенную продолжительность действия в модели устойчивого неоваскулярного пропотевания D, L-AAA.

Влияние четырехкратного увеличения дозы на продолжительность действия афлиберцепта по ингибированию хронического пропотевания сосудов сетчатки в модели D, L-AAA определяли в этом примере.

Используемыми животными были новозеландские белые кролики через 3 месяца после индукции болезни DL-AAA (DL- α -аминоадипиновой кислотой). Группы лечения представляли собой:

Плацебо (буфер для состава) 50 мкл/глаз; n=6 глаз

Афлиберцепт, 500 мкг/глаз по 50 мкл; n=7 глаз

Афлиберцепт, 2 мг/глаз по 50 мкл; n=8 глаз

Состав, используемый в каждой группе лечения, представлял собой: 10 мМ гистидина, 8% сахарозы, 0,03% PS20, pH 5,8. Офтальмологические обследования, которые проводились на исходном уровне и на 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 13 и 18 неделях, включали определение внутриглазного давления (ВГД), визуализацию в бескрасном свете (RF) (для определения морфологии кровеносных сосудов), флуоресцентную ангиографию (ФАГ; для определения пропотевания сосудов), оптическую когерентную томографию (ОКТ; для выявления воспаления стекловидного тела). Сыворотку (антитела против лекарственного средства) и плазму (уровни лекарственного средства) собирали в начале исследования и на 1, 2, 4, 6 и 9 неделях.

Данные обследования при помощи ФАГ для каждой группы представлены на фиг. 21. Эти данные продемонстрировали, что ингибирование пропотевания сосудов в сетчатке животных, получавших более высокие дозы афлиберцепта, длилось дольше, чем у животных, получавших более низкие дозы. Количество обработанных глаз, в которых проницаемость сосудов была полностью подавлена, было значительно больше в группе, получавшей дозу 2 мг, во все временные точки отбора образцов вплоть до 18 недель после введения дозы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный фармацевтический состав, содержащий
 слитый белок рецептора фактора роста сосудистого эндотелия (ФРЭС) в концентрации по меньшей мере 100 мг/мл, причем слитый белок рецептора ФРЭС содержит два полипептида, каждый из которых содержит иммуноглобиноподобный (Ig) домен 2 VEGFR1, домен 3 Ig VEGFR2 и мультимеризующий компонент;

10-100 мМ L-аргинина;

сахарозу;

- буфер на основе гистидина и поверхностно-активное вещество; причем состав имеет pH от 5,0 до 6,8.
2. Состав по п.1, который подходит для интравитреального введения.
 3. Состав по любому из пп.1, 2, дополнительно содержащий натрий сульфат, натрий тиоцианат, глицин, NaCl, натрий аспартат и/или натрий глутамат.
 4. Состав по любому из пп.1-3, в котором слитый белок рецептора ФРЭС представляет собой:
 - (i) слитый белок рецептора ФРЭС, содержащий два полипептида, которые содержат (1) компонент VEGFR1, содержащий аминокислоты с 27 по 129 из SEQ ID NO: 2; (2) компонент VEGFR2, содержащий аминокислоты 130-231 из SEQ ID NO: 2; и (3) мультимеризующий компонент, содержащий аминокислоты 232-457 из SEQ ID NO: 2;
 - (ii) слитый белок рецептора ФРЭС, содержащий два полипептида, которые содержат иммуноглобулиноподобный (Ig) домен 2 VEGFR1, домен 3 Ig VEGFR2, домен 4 Ig VEGFR2 и мультимеризующий компонент; или
 - (iii) слитый белок рецептора ФРЭС, содержащий два полипептида VEGFR1R2-FcΔC1 (а), кодируемые последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1.
 5. Состав по любому из пп.1-4, в котором слитый белок рецептора ФРЭС выбран из группы, состоящей из афлиберцепта и конберцепта.
 6. Состав по любому из пп.1-5, содержащий 103-126 мг/мл афлиберцепта, 10 ± 1 мМ буфера на основе гистидина, $5 \pm 0,5\%$ (мас./об.) сахарозы, $0,02-0,04\%$ (мас./об.) полисорбата 20 и 50 ± 5 мМ L-аргинина, с pH 5,5-6,1.
 7. Состав по любому из пп.1-6, в котором слитый белок рецептора ФРЭС находится в концентрации: 100 мг/мл; 111,5 мг/мл; 112,0 мг/мл; 113,3 мг/мл; 114,3 мг/мл; 115,6 мг/мл; 116,3 мг/мл; 120 мг/мл; 133 мг/мл; 140 мг/мл; 150 мг/мл; 200 мг/мл или 250 мг/мл.
 8. Состав по любому из пп.1-7, в котором:
 - (i) осмоляльность составляет от 299 до 506 ммоль/кг и/или
 - (ii) вязкость составляет 6-15 сП при 20°C.
 9. Состав по любому из пп.1-8, в котором pH составляет от 5,8 до 6,5.
 10. Состав по п.9, в котором pH составляет 5,8.
 11. Состав по любому из пп.1-10, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество.
 12. Состав по п.11, в котором неионогенное поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188, полиэтиленгликоля 3350 и их смесей.
 13. Состав по любому из пп.1-12, в котором буфер на основе гистидина содержит гистидин гидрохлорид.
 14. Состав по п.13, содержащий от 5 до 25 мМ буфера на основе гистидина.
 15. Состав по любому из пп.1-14, содержащий $2,5\%$ (мас./об.), 5% (мас./об.), 8% (мас./об.), 10% (мас./об.) или 20% (мас./об.) сахарозы.
 16. Состав по любому из пп.1-15, содержащий поверхностно-активное вещество в концентрации $0,03\%$ (мас./об.).
 17. Состав по любому из пп.1-16, в котором L-аргинин представляет собой L-аргинин моногидрохлорид.
 18. Состав по любому из пп.1-17, в котором слитый белок рецептора ФРЭС имеет менее $3,5\%$ высокомолекулярных соединений сразу после получения и очистки и/или имеет менее или 6% высокомолекулярных соединений после хранения в течение 24 месяцев при температуре $2-8^\circ\text{C}$.
 19. Состав по п.1, содержащий компоненты:
114,3 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 5% (мас./об.) сахарозы, $0,03\%$ (мас./об.) полисорбата 20 и 50 мМ L-аргинина, с pH 5,8.
 20. Состав по п.19, в котором афлиберцепт содержит менее $3,5\%$ высокомолекулярных соединений сразу после получения и очистки и/или содержит менее или 6% высокомолекулярных соединений после хранения в течение 24 месяцев при $2-8^\circ\text{C}$.
 21. Устройство для инъекции, содержащее состав по любому из пп.1-20.
 22. Устройство для инъекции по п.21, которое представляет собой шприц, шприц-ручку или предварительно заполненный шприц.
 23. Способ получения состава по любому из пп.1-20, включающий объединение компонентов указанного состава в единую композицию.
 24. Способ по п.23, дополнительно включающий загрузку объема состава или фармацевтического состава в шприц.
 25. Фармацевтический состав, который является продуктом способа по любому из пп.23, 24.
 26. Способ введения субъекту фармацевтического состава по любому из пп.1-20 и 25, включающий интраокулярную инъекцию фармацевтического состава в глаз субъекта.

27. Способ лечения ангиогенного заболевания глаз у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение интраокулярной инъекции 8 мг или более слитого белка рецептора ФРЭС, содержащего два полипептида, каждый из которых содержит иммуноглобуноподобный (Ig) домен 2 VEGFR1, домен 3 Ig VEGFR2 и мультимеризующий компонент, в глаз субъекта.

28. Способ по п.27, включающий введение 8 мг слитого белка рецептора ФРЭС в глаз субъекта.

29. Способ лечения ангиогенного заболевания глаз у субъекта, нуждающегося в этом, включающий интраокулярную инъекцию более чем 2 мг слитого белка рецептора ФРЭС в фармацевтическом составе по любому из пп.1-20 и 25 в глаз субъекта.

30. Способ по п.29, включающий инъекцию 8 мг слитого белка рецептора ФРЭС в глаз субъекта.

31. Способ по любому из пп.26-30, в котором интраокулярная инъекция представляет собой интравитреальную инъекцию.

32. Способ по любому из пп.27-31, в котором ангиогенное заболевание глаза представляет собой возрастную дегенерацию желтого пятна (влажная форма), отек желтого пятна, макулярный отек после окклюзии вены сетчатки, окклюзию вены сетчатки (ОВС), окклюзию центральной ветки вены сетчатки (ОВВС), окклюзию ветки вены сетчатки (ОВВС), диабетический макулярный отек (ДМО), хориоидальную неоваскуляризацию (ХНВ), неоваскуляризацию радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, послеоперационный фиброз при глаукоме, пролиферативную витреоретинопатию (ПВР), неоваскуляризацию на диске зрительного нерва, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, витреальную неоваскуляризацию, панныс, птериgium, сосудистую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, непролиферативную диабетическую ретинопатию и/или пролиферативную диабетическую ретинопатию.

33. Способ по любому из пп.26-32, в котором слитый белок рецептора ФРЭС вводят в количестве 100 мкл или менее, 90 мкл, 80 мкл, 75 мкл, 70 мкл, 60 мкл или 50 мкл.

34. Способ по любому из пп.26-33, в котором слитый белок рецептора ФРЭС содержится в фармацевтическом составе, содержащем: 5% сахарозы; буфер на основе гистидина и 0,03% поверхностно-активного вещества.

35. Способ по любому из пп.26-34, в котором 8,0 мг слитого белка рецептора ФРЭС вводят один раз каждые 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 недели.

36. Способ по п.32, в котором ангиогенное заболевание глаз представляет собой влажную возрастную дегенерацию желтого пятна.

37. Способ по п.32, в котором ангиогенное заболевание глаз представляет собой диабетическую ретинопатию.

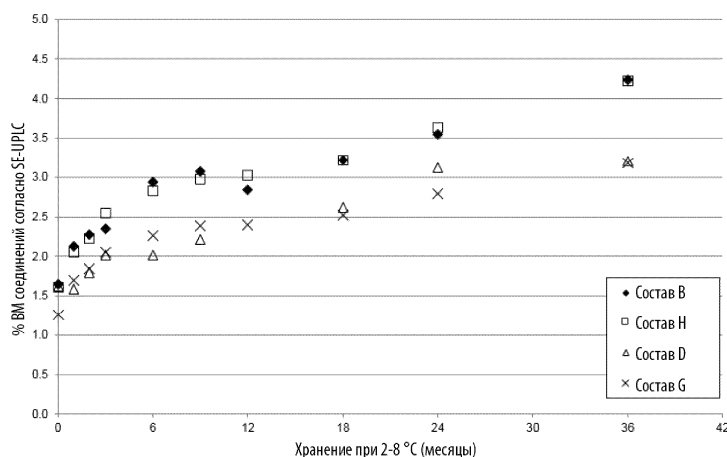
38. Способ по п.32, в котором ангиогенное заболевание глаз представляет собой диабетический макулярный отек.

39. Способ по п.32, в котором ангиогенное заболевание глаз представляет собой отек желтого пятна после окклюзии вены сетчатки.

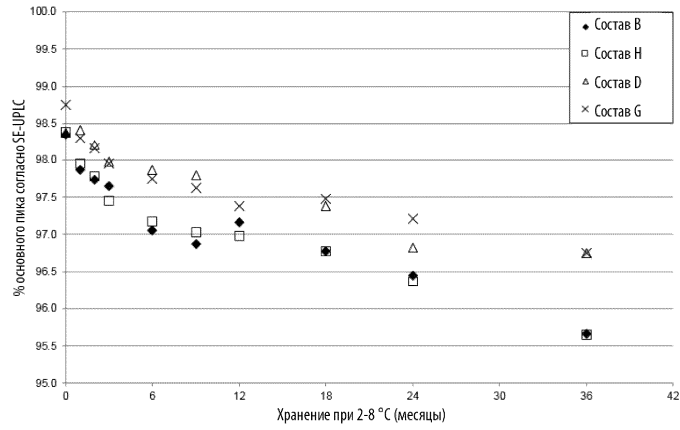
40. Состав по п.1, который содержит 140 мг/мл афлиберцепта; 20 мМ буфера на основе гистидина; 5% сахарозы; 0,03% полисорбата 20; 10 мМ L-аргинина; pH 5,8.

41. Состав по п.1, который содержит 140 мг/мл афлиберцепта, 10 мМ буфера на основе гистидина, 2,5% (вес./об.) сахарозы, 2,0% (вес./об.) пролина, 0,03% (вес./об.) полисорбата 20 и 50 мМ L-аргинина, pH 5,8.

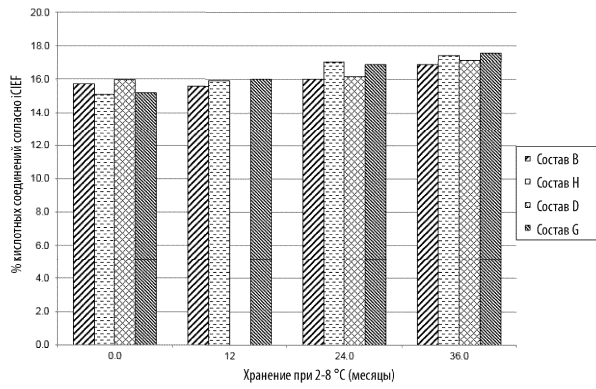
42. Предварительно заполненный шприц, содержащий состав по любому из пп.1-20, 25, 40 и 41.



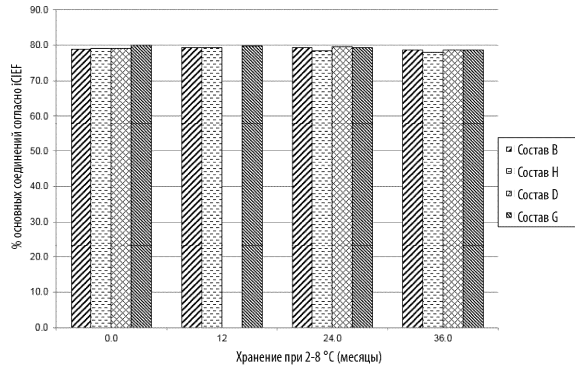
Фиг. 1А



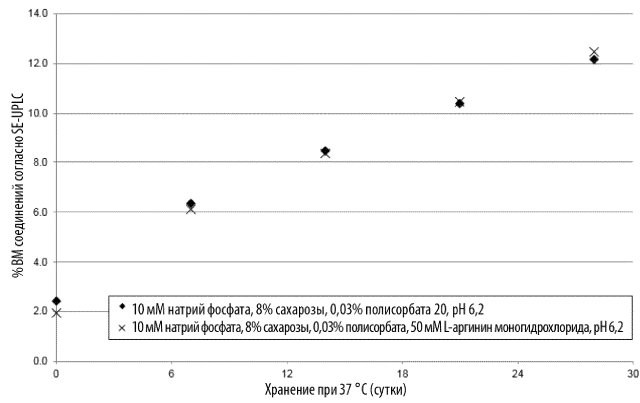
Фиг. 1В



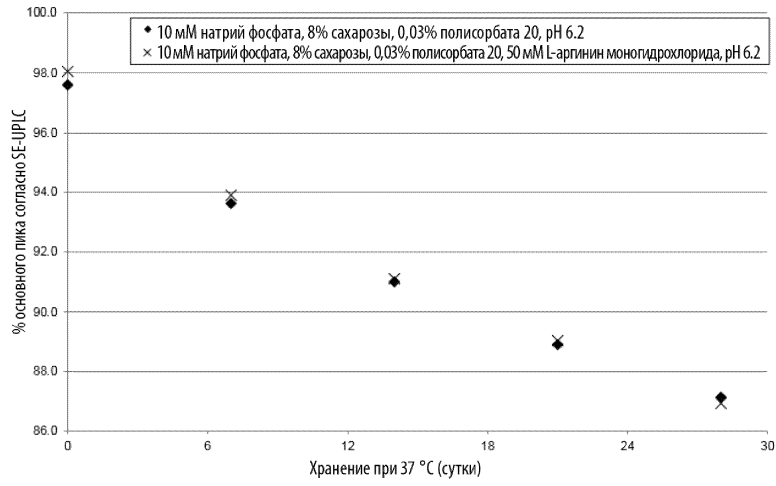
Фиг. 1С



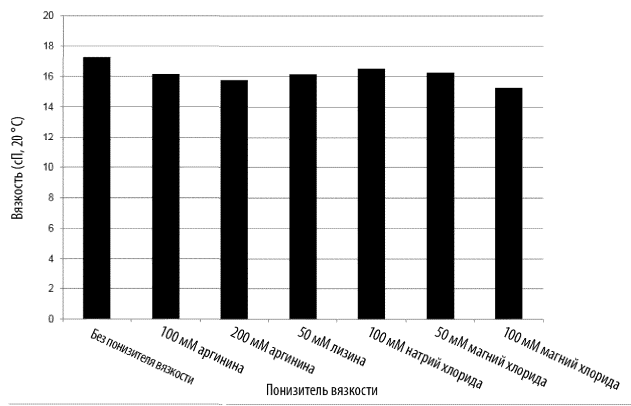
Фиг. 1D



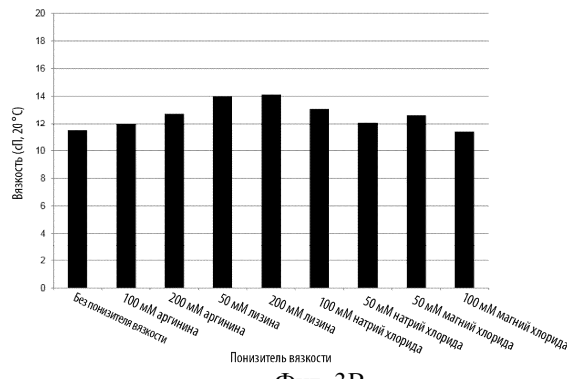
Фиг. 2А



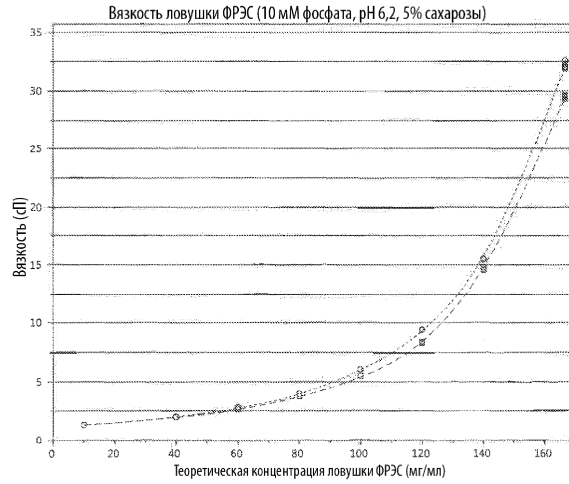
Фиг. 2В



Фиг. 3А

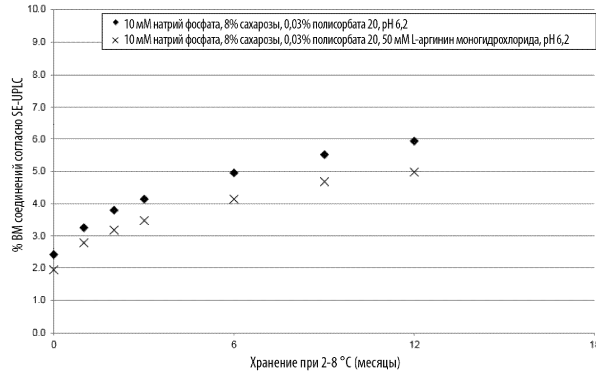


Фиг. 3В

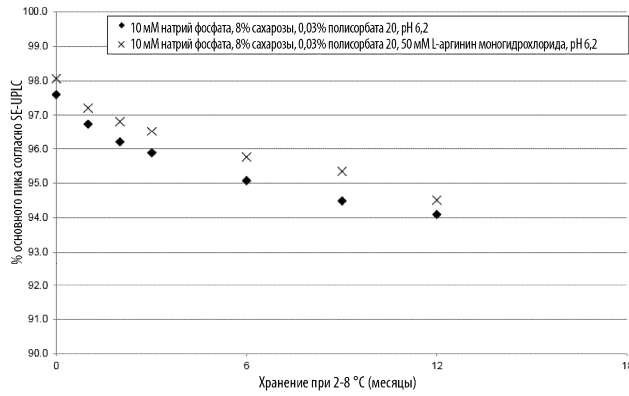


Концентрация аргинина / температура
 ○ 0 мМ / 20 °С
 □ 50 мМ / 20 °С
 --- 0 мМ / 20 °С со снижающим вязкость агентом
 -.- 50 мМ / 20 °С со снижающим вязкость агентом

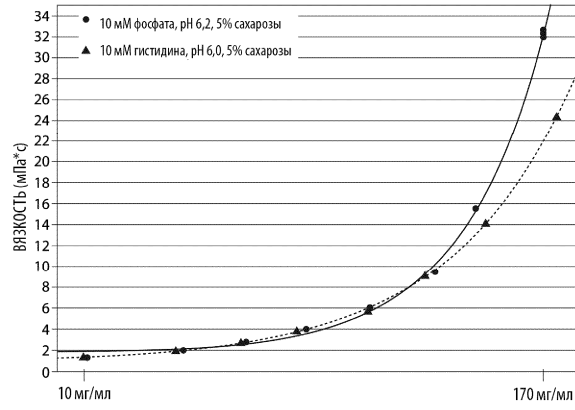
Фиг. 3С



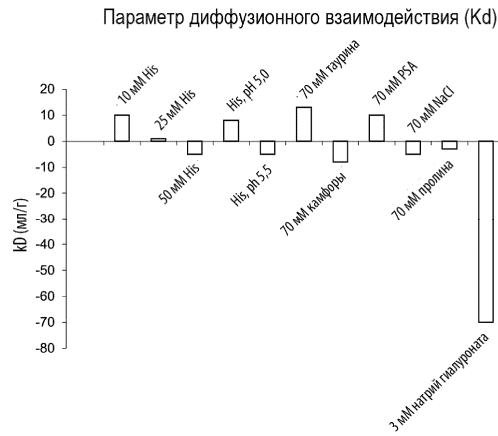
Фиг. 4А



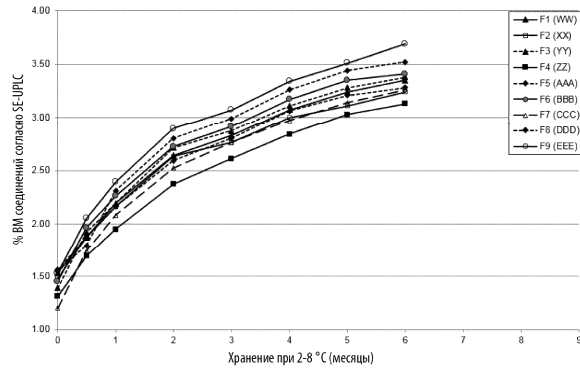
Фиг. 4В



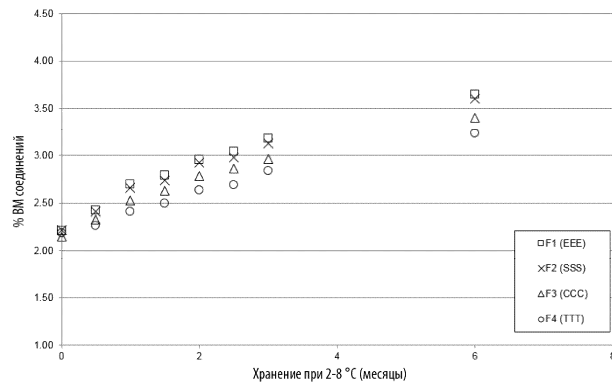
Фиг. 5



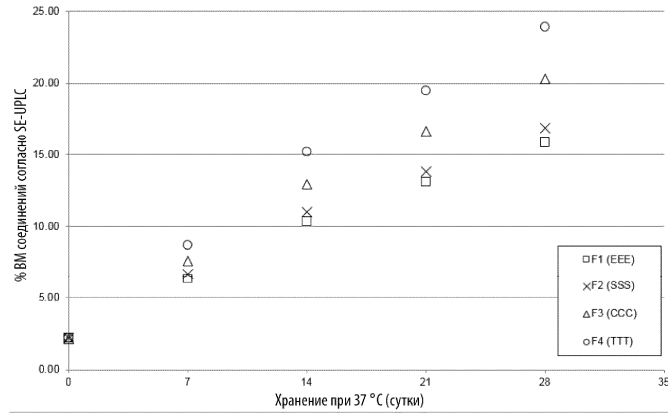
Фиг. 6



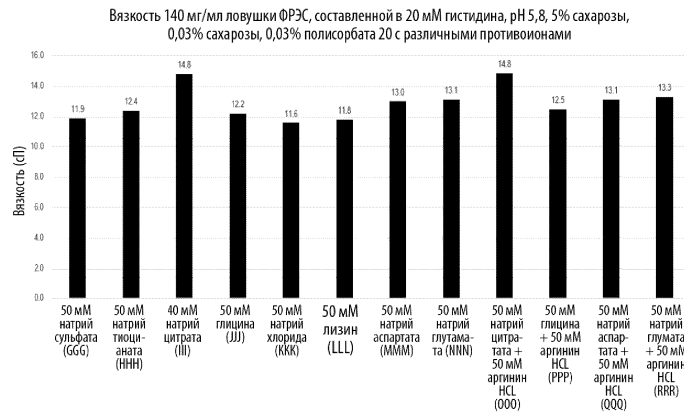
Фиг. 7



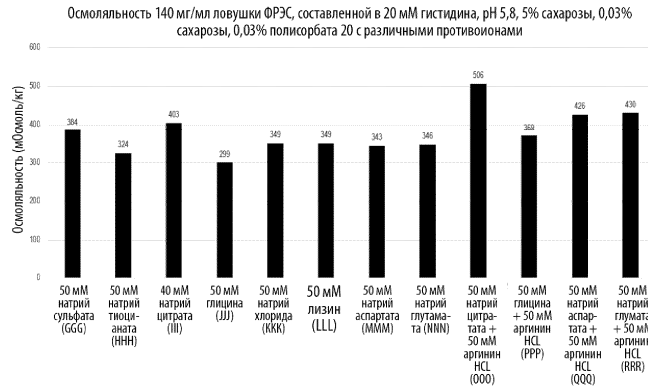
Фиг. 8А



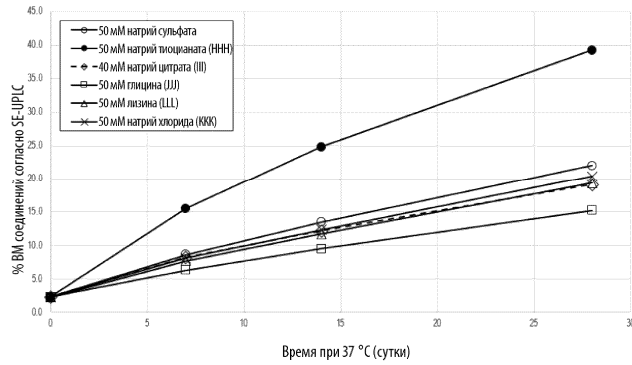
Фиг. 8В



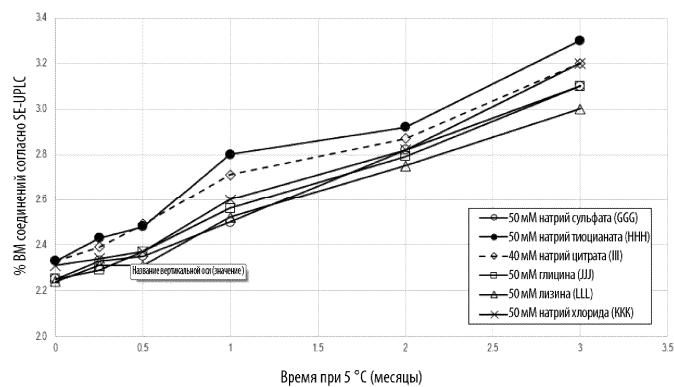
Фиг. 9



Фиг. 10



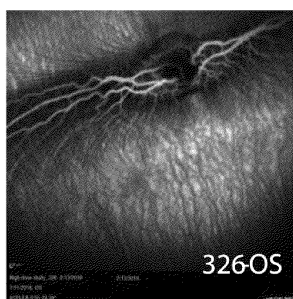
Фиг. 11А



Фиг. 11В

Составы	Коэффициент диффузии (см ² /сек)	Радиус (нм)	% P _d
F1 (50 mM натрий сульфата)	3.32E-07	7.4	15.3
F2 (50 mM натрий тиоцианата)	2.98E-07	8.2	14.7
F3 (50 mM натрий цитрата)	3.20E-07	7.7	16.3
F4 (50 mM глицина)	3.89E-07	6.3	18.9
F5 (50 mM натрий хлорида)	3.24E-07	7.6	13.8
F6 (50 mM лизина)	3.17E-07	7.7	13.6
F7 (50 mM натрий аспартата)	3.32E-07	7.4	18.2
F8 (50 mM натрий глутамата)	3.32E-07	7.4	15.0
F9 (50 mM натрий цитрата + 50 mM аргинин HCL)	3.31E-07	7.4	14.4
F10 (50 mM глицина + 50 mM аргинин HCL)	3.31E-07	7.4	14.3
F11 (50 mM натрий аспартата + 50 mM аргинин HCL)	3.24E-07	7.6	14.8
F12 (50 mM натрий глутамата + 50 mM аргинин HCL)	3.22E-07	7.6	13.3

Фиг. 12

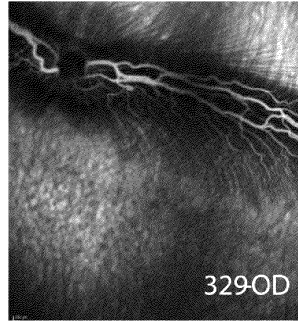


Фиг. 13А

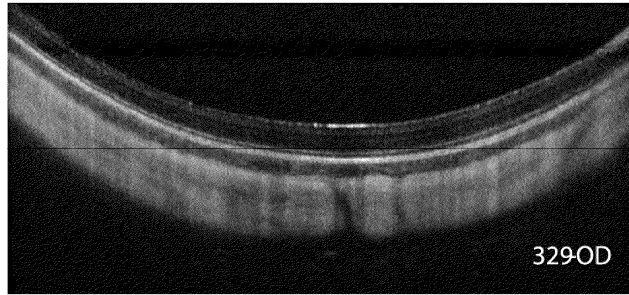


Фиг. 13В

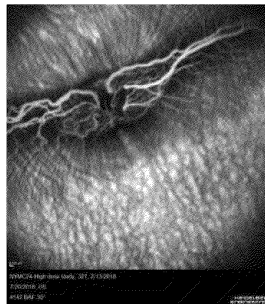
046718



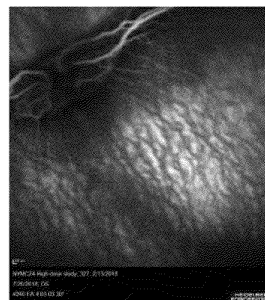
Фиг. 13С



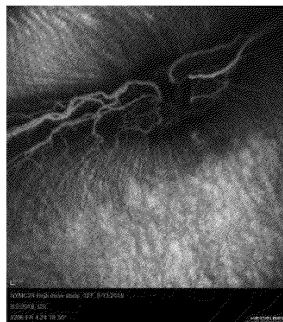
Фиг. 13D



Фиг. 14А

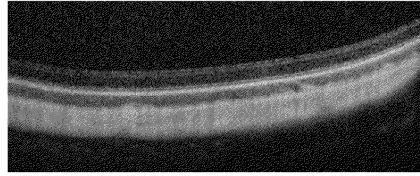


Фиг. 14В

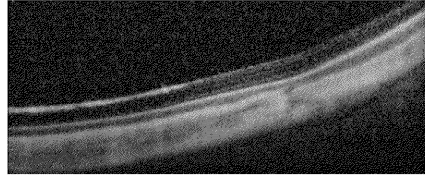


Фиг. 14С

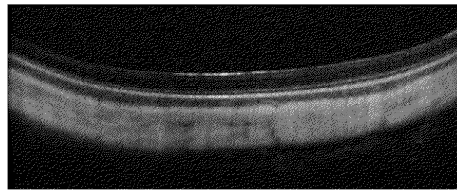
046718



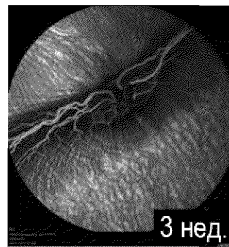
Фиг. 14D



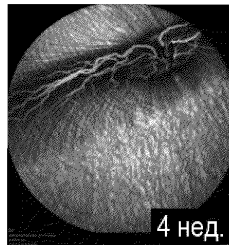
Фиг. 14E



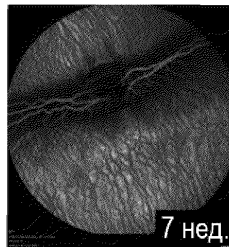
Фиг. 14F



Фиг. 15A

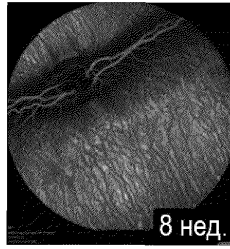


Фиг. 15B



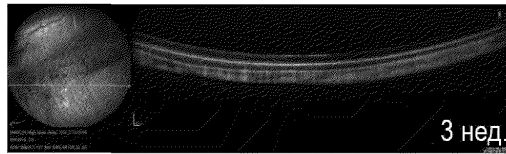
Фиг. 15C

046718

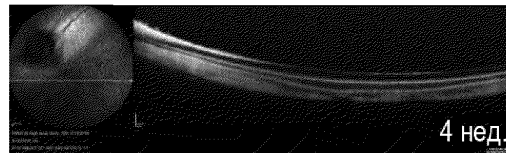


Фиг. 15D

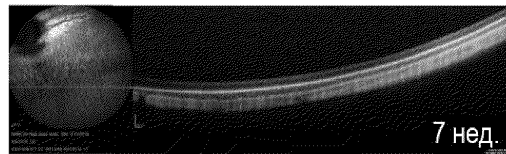
ОКТ



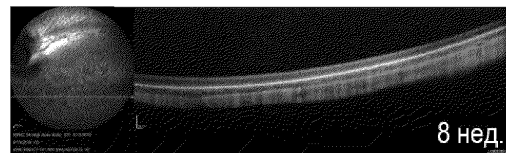
Фиг. 15E



Фиг. 15F



Фиг. 15G



Фиг. 15H

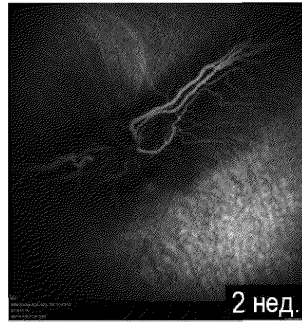


Фиг. 16A

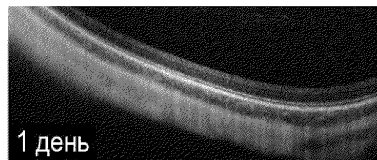
046718



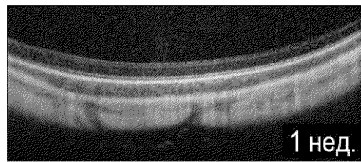
Фиг. 16В



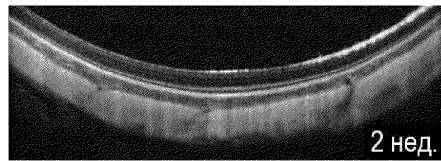
Фиг. 16С



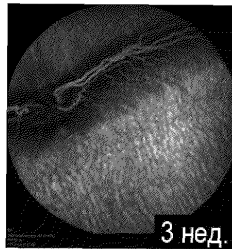
Фиг. 16D



Фиг. 16Е



Фиг. 16F

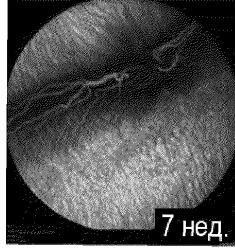


Фиг. 17А

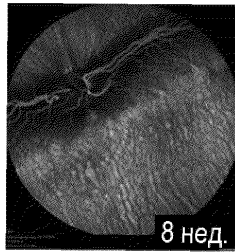
046718



Фиг. 17В

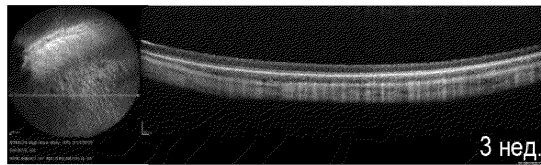


Фиг. 17С

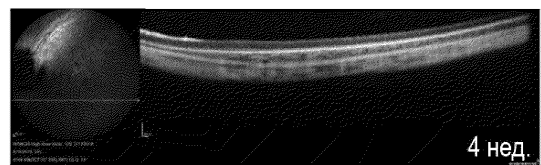


Фиг. 17D

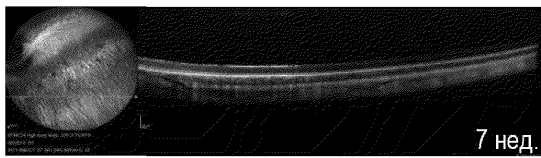
ОКТ



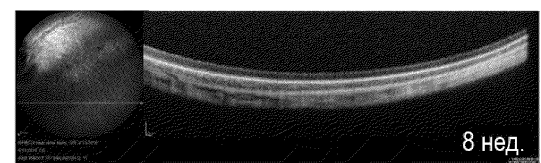
Фиг. 17Е



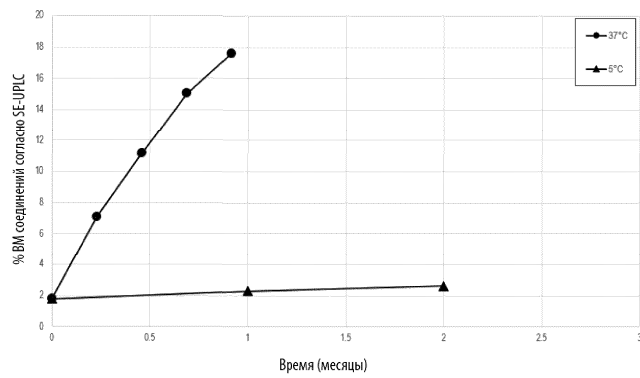
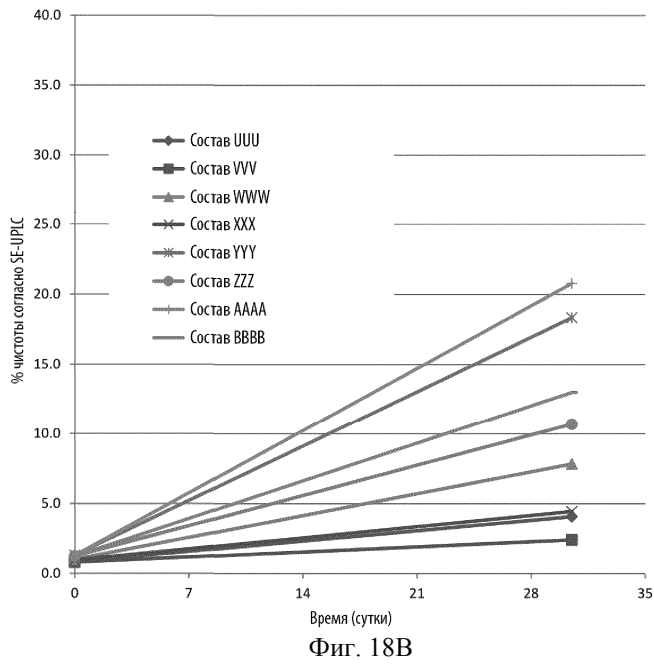
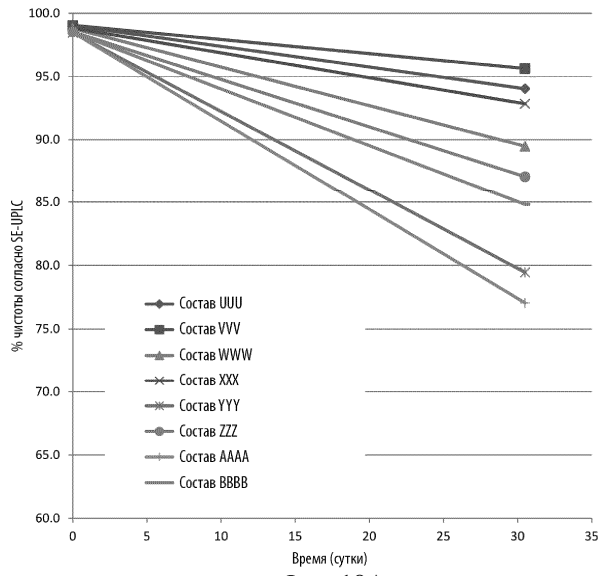
Фиг. 17F

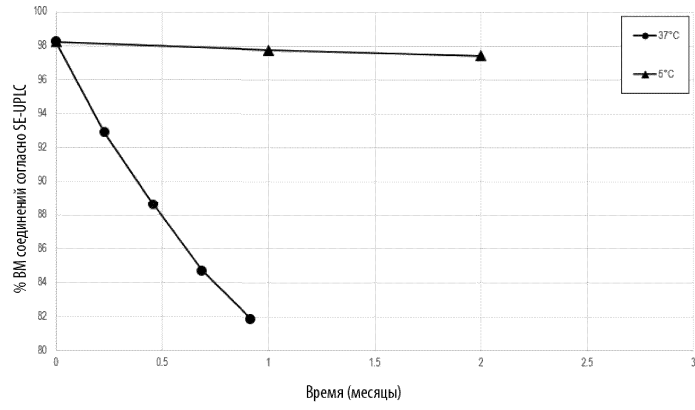


Фиг. 17G

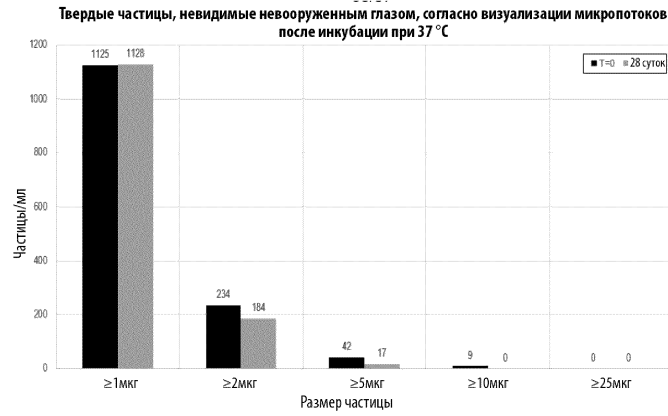


Фиг. 17H

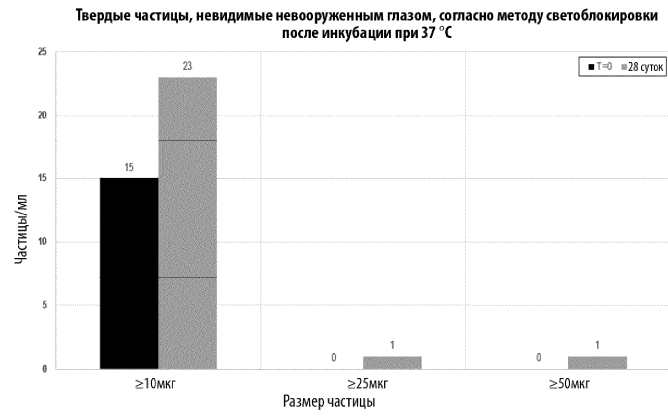




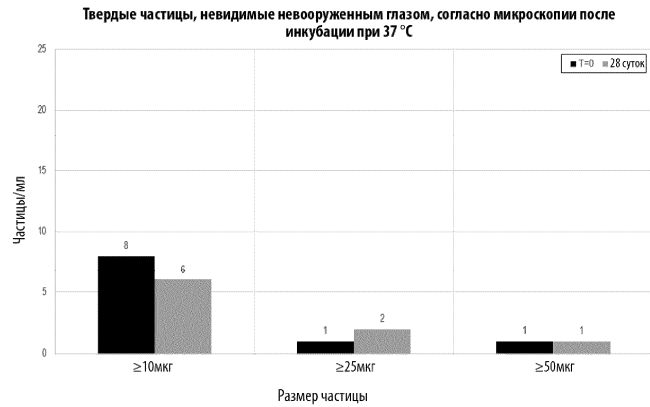
Фиг. 19В



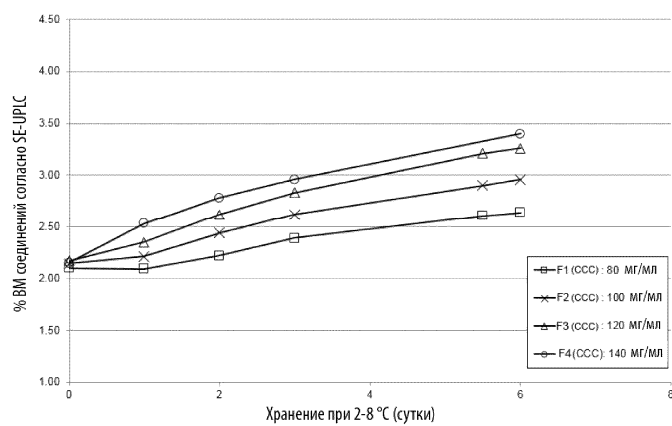
Фиг. 19С



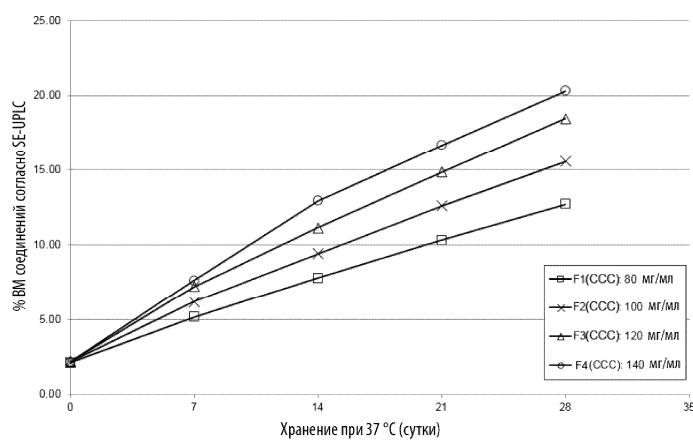
Фиг. 19D



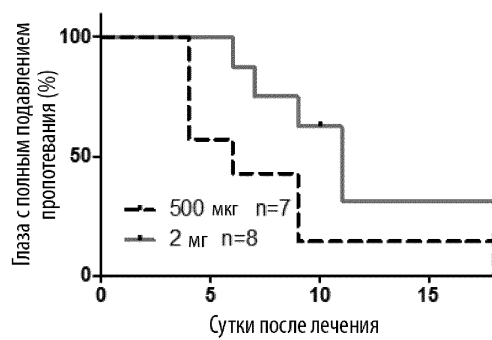
Фиг. 19Е



Фиг. 20А



Фиг. 20В



Фиг. 21

