

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047201**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.06.20**

(21) Номер заявки  
**202191403**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.11.21**

(51) Int. Cl. **A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 9/10** (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ БЕЛКА**

---

(31) **62/770,337**

(32) **2018.11.21**

(33) **US**

(43) **2021.08.09**

(86) **PCT/US2019/062596**

(87) **WO 2020/106948 2020.05.28**

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

(72) Изобретатель:  
**Чен Хангер, Шлезингер Эрика (US)**

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

(56) EP-A1-2849723  
EP-A1-2683403  
US-A1-2012230913  
US-A1-2012076800  
WO-A1-2016109822  
WO-A1-2014093203  
WO-A1-2008157409  
GARIDEL PATRICK ET AL: "High-concentration protein formulations: How high is high?", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 119, 6 July 2017 (2017-07-06), pages 353-360, XP085163178, ISSN: 0939-6411, DOI: 10.1016/J.EJPB.2017.06.029 abstract

SHIRE STEVEN J ET AL: "Challenges in the development of high protein concentration formulations", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, US, vol. 93, no. 6, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 1390-1402, XP009108986, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/JPS.20079 abstract

---

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения композиций с высокой концентрацией терапевтического белка.

---

**B1**

**047201**

**047201  
B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения композиций с высокой концентрацией терапевтического белка.

#### **Уровень техники**

Существует множество преимуществ применения подкожного введения биофармацевтических препаратов, включая композиции с высокой концентрацией белка. Преимущества подкожно вводимых композиций включают: (i) способность к самостоятельному введению, (ii) простоту использования, (iii) сокращение госпитализации и, следовательно, затрат на лечение, и (iv) повышенную приверженность пациента соблюдению инструкций. Эти преимущества особенно важны при лечении хронических заболеваний, таких как астма, псориаз или артриты. В результате увеличилось количество продаваемых биофармацевтических препаратов, которые основаны на подкожном введении.

Однако существует много проблем для успешной разработки композиций с высокой концентрацией белка для подкожного введения, включая физико-химические свойства композиций, стабильность терапевтического белка в композиции, корреляцию между агрегацией белка и концентрацией раствора, а также физические ограничения в объеме и силе при инъекции для устройств для подкожной доставки лекарственных средств. Кроме того, терапевтические белки, такие как антитела и рецепторные Fc-слитые белки, должны быть составлены таким образом, чтобы не только сделать молекулы подходящими для введения пациентам, но также сохранить их стабильность во время хранения и в месте введения.

Таким образом, существует потребность в преодолении проблем, которые до сих пор ограничивали доступность композиций с высокой концентрацией белка, исходя из объемной доли белка.

#### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для получения композиций с высокой концентрацией терапевтического белка. Более конкретно, настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам для получения композиций с высокой концентрацией белка, содержащих по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка с силой трения скольжения при инъекции менее около 50 Ньютон (Н). Эти композиции особенно подходят для подкожного введения.

Настоящее изобретение удовлетворяет потребность в композициях с высокой концентрацией белка, содержащих по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка, за счет преодоления проблем, традиционно связанных с композициями с высокой концентрацией белка. Композиция с высокой концентрацией белка по настоящему изобретению может содержать подходящий носитель в дополнение к терапевтическому белку. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка может содержать: (i) терапевтический белок; (ii) гидрофобный агент; и (iii) агент, снижающий вязкость.

Например, в одном иллюстративном варианте осуществления композиция с высокой концентрацией белка может содержать: (i) по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) 25-75 об.% гидрофобного агента; и (iii) 25-75 об.% агента, снижающего вязкость. Гидрофобный агент может быть выбран из SASOL, подсолнечного масла, касторового масла, глицерина, этилолеата, триглицеридов или их комбинаций. Триглицериды могут быть выбраны из глицерилтрикаприлата/трикапрата (Miglyol 812, Miglyol 810, Miglyol 818, Miglyol 829, Miglyol 840, CAPTEX 300, CAPTEX INJ 300, CAPTEX INJ 335 и т.п.), трикаприлат глицерина, триацетан или их комбинации. В одном иллюстративном варианте осуществления гидрофобный агент представляет собой Miglyol 812 N. Агент, снижающий вязкость, может быть выбран из этанола, бензилового спирта, бензилбензоата, этилацетата, N-метил-2-пирролидона, этиллактата, ПЭГ 400 или их комбинаций. В одном иллюстративном варианте осуществления агент, снижающий вязкость, представляет собой бензиловый спирт. В другом аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка может содержать более одного триглицерида.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, полуксамера 181, полуксамера 188,

полоксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка может содержать добавки для увеличения диспергируемости композиции. Добавка выбрана из поливинилового спирта, трилейцина или любого другого известного полимера с низкой растворимостью в воде или их комбинаций.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, полоксамера 181, полоксамера 188, полоксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит: (i) по меньшей мере около 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) от около 25% до около 75% Miglyol 812 N; и (iii) от около 25% до около 75% бензилового спирта.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, полоксамера 181, полоксамера 188, полоксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35 Н, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит: (i) по меньшей мере около 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) от около 25% до около 75% Miglyol 812 N; и (iii) от около 25% до около 75% этанола.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с

помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, полксамера 181, полксамера 188, полксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35 Н, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит: (i) по меньшей мере около 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) от около 25% до около 75% Miglyol 810N; и (iii) от около 25% до около 75% бензилового спирта.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, полксамера 181, полксамера 188, полксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35 Н, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит: (i) по меньшей мере около 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) от около 25% до около 75% триацетина; и (iii) от около 25% до около 75% бензилового спирта.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина,

цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, поллоксамера 181, поллоксамера 188, поллоксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит: (i) по меньшей мере около 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) от около 25% до около 75% триглицерида; и (iii) от около 25% до около 75% бензилового спирта.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка тонко измельчен для оптимизации возможности введения через шприц и/или стабильности. В одном иллюстративном варианте осуществления тонко измельченный белок получают с помощью сушки распылением. Концентрация белка в виде тонкоизмельченного твердого белкового порошка в композиции с высокой концентрацией белка составляет от около 200 мг/мл до около 600 мг/мл, предпочтительно от около 300 мг/мл до около 600 мг/мл, более предпочтительно от около 400 мг/мл до около 600 мг/мл.

В одном аспекте этого варианта осуществления терапевтический белок в тонкоизмельченном белковом порошке, содержащемся в композиции с высокой концентрацией белка, составлен со вспомогательными веществами. Например, вспомогательные вещества в композиции с высокой концентрацией белка могут включать (i) углевод; (ii) аминокислоту; и (iii) неионогенное поверхностно-активное вещество. Углевод может быть выбран из сахарозы, маннита, сорбита, декстрана, мальтодекстрина, трегалозы или их комбинаций. Аминокислота может быть выбрана из пролина, гистидина, изолейцина, метионина, цистеина, глицина, аргинина, лизина, L-лейцина, трилейцина, аланина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, L-треонина, 2-фениламина или их комбинаций. Неионогенное поверхностно-активное вещество может быть выбрано из полисорбата 20 (PS-20), полисорбата 28, полисорбата 40 (PS-40), полисорбата 65, полисорбата 80 (PS-80), полисорбата 81, полисорбата 85, поллоксамера 181, поллоксамера 188, поллоксамера 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонина, алкилгликозидов ( $Ri-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_n$ ); Ri независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации.

В одном аспекте этого варианта осуществления композиция с высокой концентрацией белка демонстрирует силу при инъекции менее около 50 Н, или менее 40 Н, или менее 35, или менее 30 Н, или менее 25 Н, или менее 20 Н.

Композиции с высокой концентрацией белка по настоящему изобретению могут содержаться в любом подходящем контейнере, пригодном для хранения фармацевтических композиций. Примеры таких подходящих контейнеров включают, например, стеклянные или пластиковые флаконы, шприцы и картриджи. Контейнер может быть прозрачным или непрозрачным (например, янтарного цвета). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления флаконы или шприцы покрыты силиконом, например, диоксидом кремния. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления свободное пространство во флаконах заполнено инертным газом для вытеснения любого присутствующего кислорода, который может отрицательно влиять на стабильность антитела. Такой инертный газ может быть выбран из азота или аргона. В одном иллюстративном варианте осуществления композиция с высокой концентрацией белка может содержаться в предварительно заполненном шприце.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления и их многочисленные конкретные детали, предусмотрено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены в пределах объема изобретения.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлено иллюстративное обобщение факторов, влияющих на стабильность белка и возможность введения с помощью шприца композиций в виде суспензии с высокой концентрацией белка согласно варианту осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2 представлен линейный график, иллюстрирующий силу трения скольжения в Ньютонах (Н) для носителей, содержащих агент, снижающий вязкость (растворитель), в Miglyol 810N. Ось X отображает процентное содержание агента, снижающего вязкость (растворителя), в носителе (как % растворителя). Точки данных с закрашенным ромбом представляют собой носитель, содержащий NMP в Miglyol 810N; точки данных с закрашенными квадратами представляют собой носитель, содержащий этилацетат в Miglyol 810N; а точки данных с закрашенными треугольниками представляют собой носитель, содержащий этанол в Miglyol 810N. Ось Y отображает силу при дозировании в Ньютонах (Н).

На фиг. 3 представлен линейный график, иллюстрирующий силу при дозировании (например, постоянную силу) для носителей, состоящих из гидрофобного агента и агента, снижающего вязкость (например, растворителя), согласно иллюстративному варианту осуществления настоящего изобретения. Ось X отображает процентное содержание агента, снижающего вязкость, в носителе (как % растворителя). Точки данных с закрашенными квадратами представляют собой носитель, содержащий бензиловый спирт в Miglyol 812N; точки данных с закрашенными треугольниками представляют собой носитель, содержащий этилолеат в Miglyol 812N; точки данных с закрашенными кружочками представляют собой носитель, содержащий этанол в Miglyol 812N; точки данных с крестиком представляют собой носитель с 25% этанола, 25% ПЭГ 400 и 50% Miglyol 812N; а незакрашенные кружочки представляют собой носитель, содержащий этанол в Miglyol 810N. Ось Y отображает силу при дозировании в Ньютонах (Н).

На фиг. 4 представлена диаграмма рассеяния, иллюстрирующая силу при дозировании для суспензий с высокой концентрацией, содержащих mAb1, приготовленных в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения. Ось X отображает процентное содержание агента, снижающего вязкость (растворителя), в носителе (как % растворителя). Точки данных с закрашенными кружочками представляют собой носитель, содержащий бензиловый спирт в Miglyol 812N; точки данных с закрашенными ромбами представляют собой носитель, содержащий этанол в Miglyol 812N; а точки данных с незакрашенными ромбами представляют собой носитель, содержащий этанол в Miglyol 810N. Ось Y отображает силу при дозировании в Ньютонах (Н).

На фиг. 5 представлена столбчатая диаграмма, иллюстрирующая влияние концентрации суспензии тонкоизмельченного белкового порошка на силу при дозировании для суспензий с высокой концентрацией, содержащих mAb1, приготовленных в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения. По оси X представлен вес в мг высушенного распылением порошка на мл носителя. Ось Y отображает силу при дозировании в Ньютонах (Н).

На фиг. 6 представлена гистограмма, иллюстрирующая характеристики различных белковых порошков в зависимости от возможности введения их через шприц. Ось Y отображает силу при дозировании в Ньютонах (Н).

На фиг. 7 представлена гистограмма, иллюстрирующая физическую стабильность mAb1 в суспензионных носителях, приготовленных в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения. Ось X отображает различные агенты, снижающие вязкость (например, растворитель): контрольный образец с Miglyol 812N и без агента, снижающего вязкость (например, растворителя); с носителем, содержащим 25% этанола (EtOH) в Miglyol 812N; носителем, содержащим 25% этиллактата (EL) в Miglyol 812N; носителем, содержащим 25% бензилбензоата (BB) в Miglyol 812N в виде трех независимых препаратов; носителем, содержащим 75% бензинового спирта в Miglyol 812N. Ось Y отображает относительный процент белка mAb1, имеющего нативную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус) через 1 день при комнатной температуре, полученную с помощью эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (эксклюзионной СВЭЖХ).

На фиг. 8 представлен линейный график, иллюстрирующий стабильность терапевтического белка в носителе, приготовленном в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения. По оси X отображено время инкубации при комнатной температуре в часах. Точки данных с незакрашенными квадратами представляют собой композицию mAb1 в носителе, содержащую 50 об.% бензинового спирта и Miglyol 812N; точки данных с закрашенными ромбами представляют собой композицию mAb3 в носителе, содержащую 50 об.% бензинового спирта и Miglyol 812N; а точки данных с закрашенными кружочками представляют собой композицию mAb2 в носителе, содержащую 50 об.% бензинового спирта и Miglyol 812N. Ось Y отображает относительный процент белка mAb1, имеющего нативную конформацию (ожидаемый гидродинамический радиус) с помощью СВЭЖХ с разделением по размеру.

#### Подробное описание

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Использование подкожного введения биофармацевтических препаратов обеспечивает многочисленные преимущества, такие как возможность самостоятельного введения, простота использования, сокращение госпитализации и, следовательно, затрат на лечение, а также повышение приверженности пациентов соблюдению инструкций. Кроме того, поскольку белки обычно более стабильны в твердом состоянии, чем в растворе, и минимальные молекулярные взаимодействия ожидаются в твердом состоянии между частицами белка, можно ожидать, что белки будут более стабильными в такой суспензии с высокой концентрацией по сравнению с раствором с такой же высокой концентрацией. Однако существует много проблем при успешной разработке композиций с высокой концентрацией белка для подкожного введения (Das et al. (2015) "Commercializing High-Concentration mAbs." *BioPharm International* 29(11): 47-49; Johnson, B., & Rostovtsev, A (2017) "High Concentration Biologic Formulations: Challenges and Solutions.

Drug Discov. Develop." p. Online; S.J., S., Shahrokh, Z., & Liu, J. (2004) "Challenges in the development of high protein concentration formulations." *J. Pharm. Sci.* 93(6): 1390-1402).

При подкожном введении вязкость и стабильность белка могут быть основными ограничениями для жизнеспособных композиций с высокой концентрацией белка (например, >200 мг/мл), особенно с точки зрения изготовления и обработки, стабильности при хранении, а также совместимости с устройствами для дозирования предварительно заполненным шприцем. Например, терапевтические белки (например, антитела) в композиции склонны к разрушению, скоплению и/или нежелательным химическим модификациям, если раствор не составлен должным образом. Стабильность белка в композиции зависит не только от видов вспомогательных веществ, используемых в композиции, но и от количества и соотношения этих вспомогательных веществ относительно друг друга, а также от концентрации растворимого белка.

Из-за этих проблем большинство коммерчески одобренных лекарственных препаратов на основе моноклональных антител составляются с низкой концентрацией белка (например, ниже 100 мг/мл) и вводятся внутривенно посредством инфузий, особенно в онкологии (Wang (1999) "Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals." *Intl. J. Pharm.* 185, 129-188; Shire (2004) "Formulation and manufacturability of biologics." *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (6), 708-714; Garidel and Bassarab (2008) *In Quality for Biologics: Critical Quality Attributes, Process and Change Control, Production Variation, characterization, Impurities and Regulatory Concerns* pp. 94-113. Publishing, London, UK). Таким образом, существует необходимость преодолеть проблемы, которые до сих пор ограничивали доступность композиций с высокой концентрацией белка, исходя из объемной доли белка. (Garidel et al. "High-concentration protein formulations: how high is high?" *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* (2017) 119: 353-360; Johnson, B., & Rostovtsev, A (2017, 06 29) "High Concentration Biologic Formulations: Challenges and Solutions." *Drug Discov. Develop.* p. Online).

Разработка композиции с высокой концентрацией терапевтического белка требует оценки стабильности белка, вязкости раствора, токсичности носителя, а также силы при инъекции. В данной области техники остается необходимость в таких композициях с высокой концентрацией белка, которые могут обеспечивать по меньшей мере 200 мг/мл белка, сохраняя при этом стабильность для подкожного введения пациентам.

Разработка композиций с высокой концентрацией белка выше 200 мг/мл может быть связана с рядом проблем, которые широко обсуждались в данной области техники, например, в Shire (2004) "Formulation and manufacturability of biologics." *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (6), 708-714; Warne et al. (2011) *Development of high concentration protein biopharmaceuticals: The use of platform approaches in formulation development.* *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 208-212; Garidel et al. (2015) *Prediction of colloidal stability of high concentration protein formulations.* *Pharm Dev. Technol.* 20(3), 367-374; Allmendinger et al. (2015) *Sterile Filtration of Highly Concentrated Protein Formulations: Impact of Protein Concentration, Formulation Composition, and Filter Material.* *Pharm. Biotechnol.* 104, 3319-3329).

Существует несколько ключевых факторов, которые можно учитывать для композиций и способов для получения композиций с высокой концентрацией белка. Первый фактор - это выбор носителя. Носитель может влиять на реологические свойства и свойства возможности введения через шприц композиций с высокой концентрацией белка. В большинстве носителей гидрофобный агент сочетается с агентом, снижающим вязкость. Для обеспечения стабильности белка может быть важно, чтобы белок и вспомогательные вещества композиции были незначительно растворимы в обоих компонентах. Выбор носителя и соотношение агента, снижающего вязкость, и гидрофобного агента могут зависеть от нескольких факторов, включая стабильность белка, вязкость раствора, коллоидную стабильность и токсичность носителя.

Настоящее изобретение включает определение композиции-носителя, которая подходит для получения композиций с высокой концентрацией белка и в которой терапевтический белок является стабильным. Критерии, используемые для оценки носителей, включают стабильность и восстановление белка через 3-24 ч при комнатной температуре (например, продолжительность времени, необходимого для суспендирования и введения) и силу при инъекции (например, на плато), необходимую для распределения суспензии через иглу 27 г TW в предварительно заполненном шприце (ПЗШ; PFS - англ.: pre-filled syringe) от BD Нурак объемом 1 мл. Обоснование ограниченной стабильности состоит в том, что, по меньшей мере терапевтический белок должен быть стабильным при суспендировании и введении в носителе. Хотя композиция в идеале должна загружаться и храниться в ПЗШ, существуют и другие потенциальные подходы к композиции, которые можно использовать, включая суспензию в гидрофобном агенте для хранения и добавление агента, снижающего вязкость, для снижения вязкости непосредственно перед введением, или суспензию в носителе гидрофобном агенте/агенте, снижающем вязкость, непосредственно перед введением с использованием заказного устройства. Композиция-носитель с гидрофобным агентом и агентом, снижающим вязкость, служит для отдельной цели. Гидрофобный агент обеспечивает суспензию с коллоидной стабильностью как во время хранения, так и при введении, а агент, снижающий вязкость, снижает вязкость.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления гидрофобный агент выбран из SASOL,

подсолнечного масла, касторового масла, глицерина, этилолеата, триглицеридов или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления гидрофобный агент представляет собой триглицерид, такой как, но не ограничиваясь ими, Miglyol 810 N, Miglyol 812 N, триацетин или их комбинации, а агент, снижающий вязкость, выбран из этанола, бензилового спирта, этилацетата, N-метил-2-пирролидона или их комбинаций.

Второй фактор, который следует учитывать для композиций и способов для получения композиций в виде суспензий с высокой концентрацией, это физические свойства терапевтического белка. Оптимизированная композиция в этом контексте имеет высокое содержание белка и минимальное количество вспомогательных веществ, чтобы максимизировать концентрацию белка в суспензии. Коллоидная нестабильность композиций с высокой концентрацией белка более выражена при более высоких концентрациях (Wagner et al. (2012) *Colloids and Surfaces: Physicochem. Eng. Aspects* 415, 421-430; Shire (2004) "Formulation and manufacturability of biologics." *Curr. Opin. Biotechnol.* 20 (6), 708-714; Warne et al. (2011) "Development of high concentration protein biopharmaceuticals: The use of platform approaches in formulation development." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 78, 208-212; Garidel et al. (2015) "Prediction of colloidal stability of high concentration protein formulations." *Pharm Dev. Technol.* 20(3), 367-374; and Wagner et al. (2012) "The electrokinetic potential of therapeutic proteins and its modulation: Impact on protein stability" *Colloids and Surfaces: Physicochem. Eng. Aspects* 415, 421-430). В некоторых случаях, чтобы преодолеть проблему стабильности белка, были разработаны лиофилизированные композиции для композиций с высокой концентрацией в качестве альтернативы жидким композициям (Cao et al. (2013) "Rational design of lyophilized high concentration protein formulations-mitigating the challenge of slow reconstitution with multidisciplinary strategies" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 287-293). Однако было замечено, что время восстановления лиофилизированных композиций с высокой концентрацией белка чрезвычайно увеличено, до 30 мин и более (Garidel et al. (2015) "Stability of buffer-free freeze-dried formulations: A feasibility study of a monoclonal antibody at high protein concentrations" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97, 125-139).

Хотя сушка распылением стала возможным подходом для стабилизации белков, можно использовать и другие методы стабилизации белков. Физические свойства белка и соответствующие коллоидные свойства композиции могут зависеть от таких процессов, как сушка распылением. Например, было показано, что увеличение размера частиц в микронном диапазоне может фактически уменьшить силу при инъекции, особенно при более высоких концентрациях суспензии (см., например, патент США № 9072668), и было продемонстрировано на компьютерном моделировании, что полусферические частицы будут предположительно диспергироваться медленнее, чем сферические частицы для данной силы при инъекции, и с большей вероятностью засорят иглу во время дозирования, чем сферические частицы того же размера и состава. (Whitaker et al. (2011) "Particle size and shape effects in medical syringe needles: experiments and simulations for polymer microparticle injection." *Mater Sci: Mater Med*, 22: 1975-1983). Хотя эти отчеты относятся конкретно к коллоидным суспензиям, распределяемым через медицинские устройства, также существует множество исследований того, как свойства порошка, размер частиц и суспендирующая жидкость влияют на свойства жидкости коллоидальных суспензий. Например, в статье, опубликованной в журнале *Powder Technology*, в которой исследуются коллоидальные суспензии в контексте оборудования для дноуглубительных работ, подчеркивается, как при увеличении размера частиц в диапазоне 15-40 мкм зависимость вязкости суспензии от содержания твердого вещества уменьшается, а склонность к увеличению вязкости при сдвиге при суспензии с высокой концентрацией уменьшается с увеличением более мелких частиц (6 мкм). (Konijin et al (2014) "Experimental study of the viscosity of suspensions: effect of solid fraction, particle size and suspending liquid." *Powder Technology* 266:61-59). Краткое изложение факторов, влияющих на стабильность белка и возможность введения через шприц композиций с высокой концентрацией белка, представлено на фиг. 1.

Некоторые добавки могут улучшить диспергируемость высушенных распылением частиц белка, и выбор этих добавок зависит от терапевтического белка и количества терапевтического белка в композиции. Например, добавки могут включать аминокислоты, углеводы, поверхностно-активные вещества и/или водорастворимые полимеры.

Настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, сейчас описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки.

#### Определения

Используемые в данном документе термины должны иметь следующие значения для соответствия контексту и не предназначены для изменения или ограничения обычного и традиционного значения, ес-

ли иное не указано в другом месте в данном документе.

Формы единственного числа следует понимать как означающие "по меньшей мере один"; и термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные точки.

Подразумевается, что используемые в данном документе термины "включают", "включает" и "включающий" являются неограничивающими и понимаются как имеющие значение "содержат", "содержит" и "содержащий" соответственно.

Разработка композиции с высокой концентрацией белка приводит к возникновению ряда проблем, связанных с изготовлением, стабильностью, анализом и доставкой. С помощью композиции с высокой концентрацией белка по настоящему изобретению предпринимают попытку решить эту проблему.

Композиции с высокой концентрацией белка.

Используемый в данном документе термин "высокая концентрация" означает конечную концентрацию терапевтического белка в композиции по меньшей мере около 200 мг/мл. В иллюстративных вариантах осуществления высокая концентрация терапевтического белка может составлять около 200 мг/мл или больше.

Используемый в данном документе термин "композиция с белком" относится к терапевтическому белку, который составлен вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в схеме лечения.

Используемый в данном документе термин "суспензия" относится к композиции, в которой незначительно растворимые твердые частицы диспергированы во второй фазе, носитель обычно представляет собой жидкость. Термин "суспензия" описывает дисперсию без ссылки на размер частиц твердого материала. Однако размер частиц твердого материала может влиять как на его физические, так и химические характеристики, поэтому обычно различают коллоидную или коллоидальную суспензию с диапазоном размеров частиц до около 1 мкм и "крупнозернистую дисперсию" с более крупными частицами. Используемый в данном документе термин "суспензия" охватывает оба эти вида суспензий в дополнение к суспензиям с твердыми частицами, обычно в диапазоне от около 0,1 мкм до около 10 мкм. Суспензии состоят из множества частиц, что приводит к взаимодействию множества частиц. Эти взаимодействия можно до некоторой степени рассматривать как взаимодействия диффузных слоев вокруг отдельных частиц, и, следовательно, двойной электрический слой обеспечивает основу для понимания взаимодействий между частицами. Поведение частиц в суспензии сложное, даже если рассматривать только две отдельные взаимодействующие частицы; поведение в конечном итоге зависит от относительного вклада энергии отталкивания и энергии притяжения на любом расстоянии разделения. Радиус частицы, по-видимому, влияет как на энергию притяжения, так и на энергию отталкивания. Его можно относительно легко контролировать путем помола или тонкого измельчения более крупных частиц для достижения желаемого небольшого размера частиц или с помощью методов инженерии кристаллов, предназначенных для получения мелких частиц непосредственно из раствора.

Используемый в данном документе термин "белок" включает любой аминокислотный полимер, имеющий более около 50 аминокислот, ковалентно связанных посредством амидных связей. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей аминокислот, обычно известных в данной области как "полипептиды". Белок может содержать один или несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. "Полипептиды" обычно содержат более 50 аминокислот, тогда как "пептиды" обычно содержат 50 аминокислот или меньше.

Используемый в данном документе термин "терапевтический белок" включает любой из белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и Fc-слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифичных антител. В другом аспекте белок может содержать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как система бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia* sp.) и системы млекопитающих (например, CHO-клетки и производные CHO-клеток, такие как CHO-K1-клетки). Для недавнего обзора биотерапевтических белков и их получения см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 *Biotechnol Genet Eng. Rev.* 147-75 (2012). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), тус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п.

Используемый в данном документе термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные ди-

сульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или  $V_H$ ) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$ . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или  $V_L$ ) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен ( $C_{L1}$ ).  $V_H$ - и  $V_L$ -области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных иллюстративных вариантах осуществления изобретения FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетраатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а scFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с сопоставимой аффинностью с таковым исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать многомолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит (i) по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка и (ii) носитель. "Носитель" может представлять собой носитель, в котором терапевтический белок составляет и/или вводится. Носитель может содержать гидрофобный агент, агент, снижающий вязкость, воду или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит (i) по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка; (ii) гидрофобный агент и (iii) агент, снижающий вязкость.

Используемый в данном документе термин "гидрофобный агент" относится к материалу, имеющему значение гидрофильно-липофильного баланса (HLB) 0-13. Примеры гидрофобных агентов представляют собой растительные масла, жирные кислоты с 8-24 атомами углерода, воск, биоразлагаемые полимеры и

амфифильные материалы. Примеры растительных масел включают миндальное масло, анисовое масло, масло абрикосовых косточек, арахисовое масло, аргановое масло, масло авокадо, масло бурачника, каяпутное масло, масло канолы, масло тмина, масло кассии, касторовое масло, масло корицы, цитронелловое масло, гвоздичное масло, кокосовое масло, масло кориандра, кукурузное масло, хлопковое масло, эвкалиптовое масло, масло примулы вечерней, масло фенхеля, масло герани, масло виноградных косточек, масло лесного ореха, конопляное масло, масло жожоба, можжевельное масло, лавандовое масло, лимонное масло, масло макадамии, мускатное масло, масло чайного дерева, масло семян маргозы, масло нероли, масло ниаули, масло мускатного ореха, оливковое масло, апельсиновое масло, пальмовое масло, пальмоядровое масло, сосновое масло, маковое масло, масло мяты болотной, масло семян тыквы, рапсовое масло, масло из рисовых отрубей, масло шиповника, масло розмарина, рутовое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло (SO - англ.: sesame oil), масло мяты, соевое масло, подсолнечное масло, масло тимьяна, масло грецкого ореха или масло зародышей пшеницы. Примеры жирных кислот включают каприловую кислоту, каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, арахидиновую кислоту, линолеовую кислоту, миристолеиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, сапиеную кислоту, олеиновую кислоту,  $\alpha$ -линоленовую кислоту, арахидоновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту, эруковую кислоту, докозагексаеновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту, докозагексаеновую кислоту, докозапентаеновую кислоту и глицерид (моноголицерид; диглицерид; триглицерид) с различной длиной цепи. Примеры биоразлагаемых полимеров представляют собой полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA), поли- $\epsilon$ -капролактон (PCL), полиортоэфиры, полигидроксibuтират (PHB), полидиоксанон, полиангидриды, политриметиленкарбонат и полифосфазены. Примеры амфифильных материалов представляют собой полиэтоксифирированное касторовое масло или его производное (вместе называемые "полиэтоксифирированное касторовое масло"), полиоксиэтиленалкиловый эфир, сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, полиоксиэтиленстеарат, блок-сополимер полиэтиленоксида ("ПЭО"), полипропиленоксид ("ППО")-ПЭО, блок-сополимер ППО-ПЭО-ППО, тетрафункциональный блок-сополимер ПЭО-ППО, такой как (ПЭО-ППО)<sub>2</sub>-(ППО-ПЭО)<sub>2</sub>, или тетрафункциональный блок-сополимер ППО-ПЭО, такой как (ППО-ПЭО)<sub>2</sub>-(ПЭО-ППО)<sub>2</sub>. Количество гидрофобного агента, присутствующего в композициях, может варьироваться от около 0,2% до 99,9%, например 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

Используемый в данном документе термин "триглицерид" относится к сложному эфиру, полученному из глицерина и трех жирных кислот. Примеры триглицеридов представляют собой глицерилтрикаприлат/трикапрат (Miglyol 812, Miglyol 810, Miglyol 818, Miglyol 829, Miglyol 840, CAPTEX 300, CAPTEX INJ 300, CAPTEX INJ 335 и т.п.), трикаприлат глицерила и триацетан.

Используемый в данном документе термин "вязкость" может означать "кинематическую вязкость" или "абсолютную вязкость". "Кинематическая вязкость" представляет собой меру сопротивления потока жидкости под действием силы тяжести. Когда две жидкости одинакового объема помещаются в одинаковые капиллярные вискозиметры и пропускаются под действием силы тяжести, вязкой жидкости требуется больше времени, чем менее вязкой жидкости, чтобы протекать через капиллярную трубку. Например, если для завершения потока одной жидкости требуется 200 секунд, а другой жидкости требуется 400 с, вторая жидкость будет в два раза более вязкой, чем первая по шкале кинематической вязкости. "Абсолютная вязкость", иногда называемая динамической или простой вязкостью, является произведением кинематической вязкости и плотности жидкости (абсолютная вязкость=кинематическая вязкость×плотность). Величина кинематической вязкости представляет собой  $L^2/T$ , где L - длина, а T - время. Обычно кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт). Единица измерения кинематической вязкости в системе СИ -  $\text{мм}^2/\text{с}$ , что составляет 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в сантипуазах (сП). Единицей абсолютной вязкости в системе СИ является миллипаскаль-секунда (мПа·с), где 1 сП=1 мПа·с.

Используемый в данном документе термин "агент, снижающий вязкость" относится к агенту, который, когда он присутствует в носителе или композиции, снижает вязкость или силу при инъекции носителя или композиции по сравнению с вязкостью или силой при инъекции носителя или композиции, в которых отсутствует агент, снижающий вязкость. Количество агента, снижающего вязкость, присутствующего в носителях или композициях с пониженной вязкостью по настоящему изобретению, может варьироваться от около 0,2% до около 99,9% композиции, например 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Агент, снижающий вязкость, может снизить вязкость или силу при инъекции носителя или композиции на по меньшей мере 5%, например, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%. Неограничивающими примерами агентов, снижающих вязкость, являются диэтилсебацат, моноэтиловый эфир диэтиленгликоля, этилацетат, этилолеат (ЕО), изопропилмирилат, линолевая кислота, пропионовая кислота, триэтилцитрат, пропиленгликоль, этанол, пропанол, изопропанол, полиэтиленгликоль, полиперфторэфиры, фторуглероды (галотан, метоксифлуран, энфлуран, изо-

флуран, севофлуран и десфлуран и т.д.), фторированный кетон, перфтордекалин, перфторакилат, перфторметакрилат, бензиловый спирт, лауриловый спирт, перфтордекалин, N-метил-2-пирролидон, гликофурил, полиэтиленгликолю (ПЭГ), алкилкетон, низший алкиловый эфир лимонной кислоты, бензилбензоат, метилбензоат, этилбензоат, n-пропилбензоат, изопропилбензоат, бутилбензоат, изобутилбензоат, втор-бутилбензоат, трет-бутилбензоат и изоамилбензоат. Используемый в данном документе термин "растворитель" используется взаимозаменяемо с "агентом, снижающим вязкость".

Термины "неводная композиция с высокой концентрацией белка", "композиция с высокой концентрацией белка", "композиция с высокой концентрацией белка" и "композиция в виде суспензии с высокой концентрацией" используются взаимозаменяемо.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка может содержать дополнительный ингредиент или вспомогательное вещество. "Вспомогательные вещества" включают различные вещества, используемые для различных целей, включая буферизацию, солюбилизацию, стабилизацию, смачивание и/или защиту белка, а также для поддержания или регулирования тоничности композиции, химической и физической стабилизации композиции. Примеры таких вспомогательных веществ хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка практически нерастворим в носителе. Используемый в данном документе термин "практически нерастворимый" относится к растворимости менее около 1 мг в 10000 мл.

Разрушение терапевтического белка в композиции с высокой концентрацией белка является одной из основных проблем, с которыми приходится сталкиваться при разработке этих композиций. Белки менее подвержены химическому разрушению в коллоидном состоянии по сравнению с жидким состоянием. В результате терапевтический белок, содержащийся в твердом состоянии, обеспечивает более высокую стабильность композиции с высокой концентрацией белка. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка присутствует в виде композиции с тонкоизмельченным твердым белком, полученной сушкой распылением. Размер частиц белка можно уменьшить за счет тонкого измельчения. Используемый в данном документе термин "тонкое измельчение" используется для описания методики уменьшения размера, при котором полученное распределение частиц по размерам составляет менее около 50 мкм. Композиция с высокой концентрацией белка может быть приготовлена любой из известных методик тонкого измельчения, таких как, но не ограничиваясь ими, тонкое измельчение на месте, помол, гомогенизация под высоким давлением, сушка распылением и сверхкритическая жидкость (SCF - supercritical fluid). Используемый в данном документе термин "композиция с тонкоизмельченным твердым белком" означает твердую композицию, содержащую белок, который можно суспендировать в носителе для получения композиции с высокой концентрацией белка. Термины "твердая композиция" и "композиция с твердым тонкоизмельченным белком" используются взаимозаменяемо. В дополнение к белку композиция с тонкоизмельченным твердым белком может содержать растворители, добавки, аминокислоты, вспомогательные вещества, температурные стабилизаторы и разбавители.

Используемый в данном документе термин "сушка распылением" представляет собой метод, при котором жидкое состояние преобразуется в форму высушенных частиц путем распыления в горячую среду для сушки. Сушка распылением может быть выполнена с помощью распылительной сушилки, такой как, помимо прочего, одноступенчатая распылительная сушилка, двухступенчатая распылительная сушилка, короткая распылительная сушилка и высокая распылительная сушилка. Некоторые иллюстративные варианты осуществления включают композицию, содержащую твердый тонкоизмельченный белок, который получают с помощью сушки распылением. Предпочтительные иллюстративные варианты осуществления содержат высушенный распылением белок в форме порошка. Раскрытые в данном документе порошки тонкоизмельченного твердого белка обеспечивают несколько преимуществ, включая, помимо прочего, повышение стабильности суспензии, однородный размер частиц и улучшенную диспергируемость. Физические свойства частиц белка и соответствующие коллоидальные свойства суспензии сильно зависят от процесса сушки распылением и от композиции (Vehring, R. (2008) "Pharmaceutical particle engineering via spray drying" 25(5): 999-1022). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления композиция с тонкоизмельченным твердым белком содержит углевод, аминокислоту и поверхностно-активное вещество. Примеры углеводов представляют собой сахарозу, маннит, сорбит, декстран, мальтодекстрин или трегалозу. Количество углеводов в композиции с тонкоизмельченным твердым белком может варьироваться от около 0,01 до около 50%, например, около 0,01%, около 0,05%, около 0,1%, около 0,5%, около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45% или около 50%. Примеры аминокислот включают пролин, гистидин, изолейцин, метионин, цистеин, глицин, аргинин, лизин, лейцин, трилейцин, аланин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, треонин и 2-фениламин. Количество аминокислот в композиции с тонкоизмельченным твердым белком может варьироваться от около 0,01 до около 20%, например, около 0,01%, около 0,05%, около 0,1%, около 0,5%, около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 10%, около 15% или около 20%. Иллюстративные неионогенные поверхностно-активные вещества представляют собой полисорбат 20 (PS-20), полисорбат 28, полисорбат 40 (PS-40), полисорбат 65, полисорбат 80 (PS-80), полисор-

бат 81, полисорбат 85, полоксамер 181, полоксамер 188, полоксамер 407, Triton X-100, Brij-35, Brij-30, Tween 20, Tween 80, дигитонин, алкилгликозиды ( $R_i-O-(CH_2)_x-R$ , где R независимо представляет собой  $CH_3$  или циклогексил ( $C_6H_{11}$ );  $R_i$  независимо представляет собой глюкозу или мальтозу и  $x=3-15$ ), Pluronic F127 или их комбинации. Количество неионного поверхностно-активного вещества в композиции с тонкоизмельченным твердым белком может варьироваться от около 0,01% до около 5%, например, около 0,01%, около 0,02%, около 0,03%, около 0,04%, около 0,05%, около 1%, около 1%, около 3%, около 4% или около 5%.

Чтобы поддерживать однородность композиции с высокой концентрацией белка, композиция с тонкоизмельченным твердым белком должна оставаться диспергируемой в носителе с течением времени. Используемый в данном документе термин "диспергируемость" используется для описания степени диспергирования порошка на отдельные частицы или агрегаты при приложении внешней дисперсионной силы. Традиционный подход к улучшению диспергируемости когезивных порошков заключается в их смешивании со вспомогательными веществами или добавками, которые изменяют силы взаимодействия частиц. В некоторых вариантах осуществления композиция с тонкоизмельченным твердым белком содержит высушенный распылением белковый порошок, который содержит добавки для улучшения диспергируемости высушенных распылением частиц. Примеры добавок, которые улучшают диспергируемость высушенных распылением частиц, включают аминокислоты, лецитин, стеарат магния, крахмал, карбоксиметилцеллюлозу натрия, альгинат натрия, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпирролидон (ПВП), гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ), поливиниловый спирт (ПВС), бета-циклодекстрин, маннит, хитозан, каррагинан, сополимеры полиэтиленоксидов (ПЭО)/полипропиленгликоля (ППГ), крахмалы, модифицированные ПЭГ, статистические сополимеры винилацетата и винилпирролидона, полиакриловую кислоту и полиакрилаты, карбонат аммония, альбумин, трилейцин, поверхностно-активные вещества или углеводы. В иллюстративных вариантах осуществления добавки, используемые для приготовления тонкоизмельченного твердого белка в форме высушенного распылением белкового порошка, выбраны из трилейцина, аминокислот, поливинилового спирта, полиэтиленгликоля, водорастворимых полимеров или их комбинаций.

Стабильность композиции с высокой концентрацией белка.

Стабильность композиции с высокой концентрацией белка может включать оценку химической стабильности, физической стабильности или функциональной стабильности. Композиции по настоящему изобретению обычно демонстрируют высокие уровни стабильности белка. Термин "стабильный", используемый в данном документе в отношении композиций, означает, что белки в композициях могут сохранять приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения в типичных условиях, определенных в данном документе. Композиция может быть стабильной, даже если содержащийся в ней белок не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного времени. При определенных обстоятельствах сохранение около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% структуры или функции белка после хранения в течение определенного времени можно рассматривать как "стабильное". Стабильность можно измерить, среди прочего, путем определения процента нативного белка, который остается в композиции после хранения в течение определенного времени при определенной температуре. Процент нативного белка может быть определен, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [экссклюзионной ВЭЖХ]), так что нативный означает неагрегированный и неразрушенный. "Приемлемая степень стабильности", как эта фраза используется в данном документе, означает, что по меньшей мере 90% нативной формы белка может быть обнаружено в композиции после хранения в течение определенного количества времени при заданной температуре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы белка могут быть обнаружены в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или более.

Определенная температура, при которой фармацевтическая композиция может храниться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около  $-80^{\circ}C$  до около  $45^{\circ}C$ , например, хранение при около  $-80^{\circ}C$ , около  $-30^{\circ}C$ , около  $-20^{\circ}C$ , около  $0^{\circ}C$ , около  $4-8^{\circ}C$ , около  $5^{\circ}C$ , около  $25^{\circ}C$ , около  $35^{\circ}C$ , около  $37^{\circ}C$  или около  $45^{\circ}C$ . Например, фармацевтическая композиция может считаться стабильной, если через 6 месяцев хранения при  $5^{\circ}C$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ определяется более чем около 95%, 96%, 97% или 98% нативного белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если через 6 месяцев хранения при  $25^{\circ}C$  с помощью эксклюзионной ВЭЖХ определяется более чем около 94%, 95%, 96%, 97% или 98% нативного белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если через 28 дней хранения при  $45^{\circ}C$  с помощью эксклюзионной

ВЭЖХ определяется более чем около 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 98% нативного белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если через 3 месяца хранения при -20°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ определяется более чем около 96%, 97% или 98% нативного белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если через 3 месяца хранения при -30°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ определяется более чем около 96%, 97% или 98% нативного белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если через 3 месяца хранения при -80°C с помощью эксклюзионной ВЭЖХ определяется более чем около 96%, 97% или 98% нативного белка.

Стабильность может быть измерена, среди прочего, путем определения процентного содержания белка, который образуется в агрегате в композиции после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, причем стабильность обратно пропорциональна процентному содержанию образовавшегося агрегата. Эта форма стабильности также называется в данном документе "коллоидальной стабильностью". Процент "агрегированного" белка можно определить, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [эксклюзионной ВЭЖХ]). "Приемлемая степень стабильности", как эта фраза используется в данном документе, означает, что максимум 6% белка находится в агрегированной форме, обнаруженной в композиции после хранения в течение определенного количества времени при заданной температуре. В некоторых вариантах осуществления приемлемая степень стабильности означает, что максимум около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка может быть обнаружено в агрегате в композиции после хранения в течение определенного времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или более. Температура, при которой фармацевтическая композиция может храниться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80°C до около 45°C, например, хранение при около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C, около 35°C, около 37°C или около 45°C. Например, фармацевтическую композицию можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 5°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 25°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после трех месяцев хранения при -20°C, -30°C или -80°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка.

Стабильность также может быть измерена, среди прочего, путем определения процентного содержания белка, который образуется в агрегате в композиции после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, причем стабильность обратно пропорциональна процентному содержанию образовавшегося агрегата. Эта форма стабильности также называется в данном документе "коллоидальной стабильностью". Процент "агрегированного" белка можно определить, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии (например, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии [эксклюзионной ВЭЖХ]). "Приемлемая степень стабильности", как эта фраза используется в данном документе, означает, что максимум 6% белка находится в агрегированной форме, обнаруженной в композиции после хранения в течение определенного количества времени при заданной температуре. В некоторых вариантах осуществления приемлемая степень стабильности означает, что максимум около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка может быть обнаружено в агрегате в композиции после хранения в течение определенного времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или более. Температура, при которой фармацевтическая композиция может храниться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80°C до около 45°C, например, хранение при около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C, около 35°C, около 37°C или около 45°C. Например, фармацевтическую композицию можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 5°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после шести месяцев хранения при 25°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно

считать стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическую композицию также можно считать стабильной, если после трех месяцев хранения при -20°C, -30°C или -80°C в агрегированной форме обнаруживается менее около 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка.

Стабильность также можно измерить, среди прочего, путем определения процента белка, который мигрирует в более кислой фракции во время ионного обмена ("кислая форма"), чем в основной фракции белка ("форма основного заряда"), где стабильность обратно пропорциональна фракции белка в кислой форме. Без необходимости связывания теорией, дезамидирование белка может привести к тому, что белок станет более отрицательно заряженным и, следовательно, более кислым по сравнению с недезамидированным белком (см, например, Robinson, N. (2002) "Protein Deamidation" PNAS, 99(8):5283-5288). Процент "подкисленного" белка можно определить, среди прочего, с помощью ионообменной хроматографии (например, катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии [катионообменная ВЭЖХ]). "Приемлемая степень стабильности", как эта фраза используется в данном документе, означает, что максимум 49% белка находится в более кислой форме, обнаруженной в композиции после хранения в течение определенного количества времени при определенной температуре. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления приемлемая степень стабильности означает, что максимум около 49%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка может быть обнаружено в кислой форме в композиции после хранения в течение определенного времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряется стабильность, может составлять по меньшей мере 2 недели, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или более.

Температура, при которой фармацевтическая композиция может храниться при оценке стабильности, может представлять собой любую температуру от около -80°C до около 45°C, например, хранение при около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4-8°C, около 5°C, около 25°C или около 45°C. Например, фармацевтическая композиция может считаться стабильной, если после трех месяцев хранения при -80°C, -30°C или -20°C в более кислой форме находится менее около 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если после шести месяцев хранения при 5°C в более кислой форме находится менее около 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если после шести месяцев хранения при 25°C в более кислой форме находится менее около 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка. Фармацевтическая композиция также может считаться стабильной, если после 28 дней хранения при 45°C в более кислой форме может быть обнаружено менее около 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка.

Для оценки стабильности композиций по настоящему изобретению можно использовать другие методы, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) для определения термической стабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и поглощение при около 350 нм или около 405 нм для определения мутности раствора. Например, композиция по настоящему изобретению может считаться стабильной, если после 6 или более месяцев хранения при температуре от около 5°C до около 25°C изменение в OD405 композиции составляет менее около 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или менее) от OD405 композиции в нулевой момент времени. Измерение биологической активности или аффинности связывания белка с его мишенью также можно использовать для оценки стабильности. Например, композиция по настоящему изобретению может считаться стабильной, если после хранения, например, при 5°C, 25°C, 45°C и т.д. в течение определенного периода времени (например, от 1 до 12 месяцев), белок, содержащийся в композиции, связывается со своей мишенью с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 90%, 95% или более от аффинности связывания белка до указанного хранения. Аффинность связывания может быть определена, например, с помощью ИФА или плазмонного резонанса. Биологическая активность может быть определена с помощью анализа активности белка, такого как, например, введение в контакт клетки, экспрессирующей белок, с композицией, содержащим  $\alpha$ -белок. Связывание белка с такой клеткой можно измерить напрямую, например, с помощью анализа FACS. Альтернативно, нижестоящая активность белковой системы может быть измерена в присутствии белка и сравниваться с активностью белковой системы в отсутствие белка. Дополнительные методы оценки стабильности белка в композиции продемонстрированы в примерах, представленных ниже.

Контейнеры для композиции с высокой концентрацией белка.

Композиции с высокой концентрацией белка по настоящему изобретению могут содержаться в любом контейнере, подходящем для хранения лекарственных средств и других терапевтических композиций. Например, фармацевтические композиции могут находиться в запечатанном и стерилизованном пластиковом или стеклянном контейнере определенного объема, таком как флакон, ампула, шприц, картридж или сосуд. Для размещения композиций по настоящему изобретению могут использоваться различные типы флаконов, включая, например, прозрачные и непрозрачные (например, янтарного цвета) стеклянные или пластиковые флаконы. Аналогично, любой тип шприца может быть использован для размещения и/или введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Композицию внутри контейнера можно обработать с использованием любого известного в данной области метода для удаления кислорода, чтобы улучшить стабильность белка, если это необходимо. Кислород в свободном пространстве (газовое пространство над жидкостью в закрытом контейнере) может быть заменен инертным газом, таким как азот или аргон.

Композиции с высокой концентрацией белка можно вводить пациенту парентеральными путями, такими как инъекция (например, подкожная, внутривенная, внутримышечная, внутривенная и т.д.) или чрескожное введение, введение через слизистую, нос, легкое и/или пероральное введение. Для подкожной доставки фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно использовать многочисленные устройства доставки в виде многоцветных шприцев-ручек и/или шприцев-тюбиков. Примеры включают, но не ограничиваются ими, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPENTM I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), не говоря уже о других. Примеры устройств доставки в виде одноразовых шприцев-ручек и/или шприцев-тюбиков, применяемых при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, шприц-ручку SOLOSTARTM (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), шприц-тюбик SURECLICK™ (Amgen, Таузенд-Оакс, Калифорния), PUSHCLICK™ (Scandinavian Health Ltd. (SHL) Group), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EIPEN (Dey, L. P.) и шприц-ручку HUMIRATM (Abbott Labs, Abbott Park, Иллинойс), не говоря уже о других.

В данном документе также рассматривается использование микрокапельницы для внутреннего вливания для доставки композиций с высокой концентрацией белка по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин "микрокапельница для внутривенного вливания" означает устройство для подкожной доставки, предназначенное для медленного введения больших объемов (например, до около 2,5 мл или более) терапевтической композиции в течение длительного периода времени (например, около 10, 15, 20, 25, 30 и более мин). См, например, патент США № 6629949; патент США № 6659982; и Meehan et al., J. Controlled Release 46:107-116 (1996), которые полностью включены в данный документ. Микрокапельницы для внутривенного вливания особенно пригодны для доставки больших доз терапевтических белков, содержащихся в высоких концентрациях (например, около 100, 125, 150, 175, 200 или более мг/мл), и/или вязких растворов.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения в данном документе также рассматривается предварительно заполненный шприц для доставки композиции с высокой концентрацией белка. Примеры шприцев доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия; Hamilton Robotics, Невада, Соединенные Штаты Америки; Tegumo, Токио, Япония; или Becton, Dickinson and Company, Нью-Джерси, Соединенные Штаты Америки. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения предварительно заполненный шприц может содержать двойную камеру для образования суспензии перед инъекцией. В некоторых вариантах осуществления одна из камер в двойной камере может содержать гидрофобный агент и агент, снижающий вязкость, а другая камера может содержать терапевтический белок. В некоторых других вариантах осуществления одна из камер в двойной камере может содержать терапевтический агент, суспендированный в гидрофобном агенте, а другая камера может содержать агент, снижающий вязкость.

Используемый в данном документе термин "возможность введения через шприц" относится к характеристике композиции, которая отражает легкость, с которой композиция протекает через иглу. Ее можно рассчитать как силу, необходимую для инъекции раствора при заданной скорости введения через иглу предварительно заданного калибра и длины. Различными терминами силы, используемыми для описания возможности введения через шприц, являются сила при введении через шприц, максимальная сила при введении через шприц и сила отрыва. Используемый в данный момент термин "сила при введении через шприц" относится к силе, необходимой для поддержания движения поршня с постоянной скоростью для вытеснения содержимого шприца. Термины "сила при введении через шприц", "поддерживаемая сила", "сила скольжения", "сила при инъекции" и "сила при дозировании" могут использоваться

взаимозаменяемо. Предполагается, что сила при введении через шприц зависит от концентрации твердого вещества в суспензии, свойств порошка и скорости дозирования. Сила при введении через шприц может быть измерена датчиком нагрузки, установленным в системе Instron. Используемый в данном документе термин "сила скольжения при введении через шприц" относится к усредненной по времени силе, необходимой для поддержания движения поршня с постоянной скоростью на его пути к переднему концу шприца. Используемый в данном документе термин "максимальная сила при введении через шприц" относится к наибольшей силе, измеренной до того, как поршень закончит свое движение на переднем конце шприца. Используемый в данном документе термин "сила отрыва" относится к силе, необходимой для начала движения поршня. Как проиллюстрировано в примерах, для большинства композиций с высокой концентрацией белка существует прямая зависимость между максимальной силой при введении через шприц и силой при введении через шприц, как определено из данных Instron.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения сила при введении через шприц, необходимая для проталкивания композиции с высокой концентрацией белка через стеклянный шприц с твердым защитным колпачком, имеющий внутренний диаметр 0,25 дюйма, обеспеченный иглой 0,5 дюйма 26½ калибра со скоростью инъекции 4 мм/с, меньше около 50 Н, например, меньше около 45 Н, меньше около 40 Н, меньше около 35 Н, меньше около 25 Н или меньше около 25 Н. В предпочтительных вариантах осуществления сила при введении через шприц меньше чем около 30 Н.

Терапевтическое применение фармацевтических композиций.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению пригодны, среди прочего, для лечения, предотвращения и/или облегчения заболевания или расстройства. Примеры неограничивающих заболеваний и нарушений, которые можно лечить и/или предотвращать введением фармацевтических композиций по настоящему изобретению, включают инфекции; заболевания дыхательной системы; боль, возникающую в результате любого состояния, связанного с нейрогенной, невропатической или ноцицептивной болью; наследственное заболевание; врожденное заболевание; рак; герпес; хроническую идиопатическую крапивницу; склеродермию, гипертрофическое рубцевание; синдром Уиппла; доброкачественное увеличение предстательной железы; заболевания легких, такие как легкая, умеренная или тяжелая астма, аллергические реакции; болезнь Кавасаки, серповидно-клеточную анемию; синдром Черджа-Стросса; болезнь Грейвса; преэклампсию; синдром Шегрена; аутоиммунный лимфопролиферативный синдром; аутоиммунную гемолитическую анемию; синдром Барретта; аутоиммунный увеит; туберкулез; нефроз; артрит, включая хронический ревматоидный артрит; воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит; системную красную волчанку; воспалительные заболевания; ВИЧ-инфекцию; СПИД; аферез ЛПНП; нарушения из-за мутаций, активирующих PCSK9 (мутации с приобретением функции "GOF"), расстройства, вызванные гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (heFH); первичную гиперхолестеринемия; дислипидемию; холестатические заболевания печени; нефротический синдром; гипотиреоз; ожирение; атеросклероз; сердечно-сосудистые заболевания; нейродегенеративные заболевания; мультисистемное воспалительное заболевание неонатального возраста (NOM ID/CINCA); синдром Макла-Уэлса (MWS); семейный холододовый аутовоспалительный синдром (FCAS); семейную средиземноморскую лихорадку (FMF); синдром периодической лихорадки, связанный с рецептором фактора некроза опухоли (TRAPS); ювенильный идиопатический артрит с системным началом (синдром Стилла); сахарный диабет 1 и 2 типа; аутоиммунные заболевания; заболевание двигательных нейронов; заболевания глаз; заболевания, передающиеся половым путем; туберкулез; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антагониста VEGF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью ингибитора PD-1; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к интерлейкину; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к NGF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела против PCSK9; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к ANGPTL; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к активину; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к GDF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к Fel d 1; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к CD; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или уменьшается с помощью антитела к C5 или их комбинации.

Иллюстративные композиции.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция с высокой концентрацией белка содержит по меньшей мере 200 мг/мл терапевтического белка. Например, композиции, описанные в этих иллюстративных вариантах осуществления, содержат терапевтический белок в концентрации по меньшей мере, по меньшей мере около 200 мг/мл, по меньшей мере около 210 мг/мл, по меньшей мере около 220 мг/мл, по меньшей мере около 230 мг/мл, по меньшей мере около 250 мг/мл, по меньшей мере около 250 мг/мл, по меньшей мере около 260 мг/мл, по меньшей мере около 270 мг/мл, по меньшей мере около 280 мг/мл, по меньшей мере около 290 мг/мл, по меньшей мере около 300 мг/мл, по меньшей мере около 320 мг/мл, по меньшей мере около 340 мг/мл, по меньшей мере около

350 мг/мл, по меньшей мере около 380 мг/мл, по меньшей мере около 400 мг/мл, по меньшей мере около 420 мг/мл, по меньшей мере около 450 мг/мл, по меньшей мере около 480 мг/мл, по меньшей мере около 500 мг/мл.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка находится в форме композиции с тонкоизмельченным твердым белком. В предпочтительных вариантах осуществления композицию с тонкоизмельченным твердым белком готовят с использованием процесса сушки распылением. В одном аспекте концентрация белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком находится в диапазоне от 1% до 99%. В другом аспекте концентрация белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком составляет по меньшей мере около 50%, например, по меньшей мере около 51%, по меньшей мере около 52%, например, по меньшей мере около 53%, по меньшей мере около 54%, например, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99%, по меньшей мере около 99,5%, по меньшей мере около 99,9%.

В процессе сушки распылением можно добавлять добавки для улучшения диспергируемости композиции с тонкоизмельченным твердым белком. Добавки, которые могут быть включены в рассматриваемую композицию с тонкоизмельченным твердым белком, включают аминокислоты, углеводы, поверхностно-активные вещества и/или водорастворимые полимеры. Углевод, который может быть включен в рассматриваемую композицию с тонкоизмельченным твердым белком, выбран из маннита, сахарозы, трегалозы, мальтодекстрина, сорбита или их комбинаций. Концентрация углеводов в композиции с тонкоизмельченным твердым белком составляет менее около 50%, например, менее около 45%, менее около 40%, менее около 35%, менее около 30%, менее около 25%, менее чем около 20%, менее около 18%, менее около 15%, менее около 12%, менее около 10%, менее около 5%, менее около 2%, менее около 1%, менее около 0,5% или менее около 0,1%. Аминокислота, которая может быть включена в рассматриваемую композицию с тонкоизмельченным твердым белком, выбрана из встречающихся в природе аминокислот и их производных. В предпочтительных вариантах осуществления аминокислота выбрана из гистидина, изолейцина, лейцина, трилейцина, глицина или их комбинаций. Концентрация аминокислоты в композиции с тонкоизмельченным твердым белком составляет менее около 20%, например, менее около 18%, менее около 15%, менее около 12%, менее около 10%, менее около 5%, менее около 3%, менее чем около 2%, менее около 1,5%, менее около 1,2%, менее около 1,0%, менее около 0,5%, менее около 0,4%, менее около 0,3%, менее около 0,2%, менее около 0,1% или менее около 0,05%. Поверхностно-активное вещество, которое может быть включено в рассматриваемую композицию с тонкоизмельченным твердым белком, выбрано из полисорбата 20, полисорбата 80, полисорбата 60, полоксамера, полиэтиленгликоля или их комбинаций. Концентрация поверхностно-активного вещества в композиции с тонкоизмельченным твердым белком составляет менее 5%, например, менее около 5%, менее около 4,5%, менее около 4%, менее около 3,5%, менее около 3%, менее чем около 2,5%, менее около 2%, менее около 1,5%, менее около 1%, менее около 0,9%, менее около 0,8%, менее около 0,7%, менее около 0,6%, менее около 0,5%, менее около 0,4%, менее около 0,3%, менее около 0,2% или менее около 0,1%.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический белок в композиции с высокой концентрацией белка доставляется путем парентерального введения. Композиция может быть введена подкожно. В одном иллюстративном варианте осуществления композиция может содержаться в предварительно заполненном шприце. Примеры предварительно заполненных шприцев доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия; Hamilton Robotics, Невада, Соединенные Штаты Америки; Teguto, Токио, Япония; или Becton, Dickinson and Company, Нью-Джерси, Соединенные Штаты Америки. Композиция может быть предварительно загружена в шприц и, таким образом, готова к инъекции без смешивания или восстановления.

Все ссылки на литературу и патентные документы включены в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение станет более понятным из следующих примеров. Однако их не следует рассматривать как ограничение объема изобретения.

### Примеры

#### Пример 1. Составление и загрузка суспензии

Следующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить рядовым специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и использовать способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают изобретением.

Несколько композиций (табл. 1), содержащих разные носители, были приготовлены в соответствии с процедурой, описанной ниже. Иллюстративные терапевтические белки, используемые в композициях, представляют собой три моноклональных антитела.

Таблица 1

Носитель	Белок	Композиция
75% Miglyol 812N, 25% бензилового спирта	mAb1	(390 мг/мл композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 82% белка в порошке, высушенном распылением)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта		
75% Miglyol 812N, 25% этанола		
50% Miglyol 812N, 50% этанола		
75% Miglyol 810N, 25% этанола		
50% Miglyol 810N, 50% этанола		
25% Miglyol 810N, 75% этанола		
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb1	(397 мг/мл композиции с тонкоизмельченным твердым белком)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb1	(516 мг/мл композиции с тонкоизмельченным твердым белком)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb1	(35% мас./об. композиции с тонкоизмельченным твердым белком)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb2	(29% мас./об. композиции с тонкоизмельченным твердым белком)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb3	(36% мас./об. композиции с тонкоизмельченным твердым белком)
75% Miglyol 812N, 25% бензилового спирта	mAb3	(274 мг/мл белка в композиции; 0,82 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,335 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)

50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb3	(304 мг/мл белка в композиции; 0,82 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,355 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)
75% Miglyol 812N, 25% бензилового спирта	mAb1	(231 мг/мл белка в композиции; 0,82 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,291 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb1	(232 мг/мл белка в композиции; 0,82 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,286 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb1	(278 мг/мл белка в композиции; 0,82 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,342 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb2	(232 мг/мл белка в композиции; 0,80 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,285 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка)

Miglyol 812 N	mAb1	400-500 мг/мл композиции с тонкоизмельченным твердым белком (82% мас./мас. mAb1)
75% Miglyol 812N, 25% этанола		
75% Miglyol 812N, 25% этилолеата		
75% Miglyol 812N, 25% бензилового спирта		
75% Miglyol 812N, 25% бензилбензоата		
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта		
25% Miglyol 812N, 75% бензилового спирта		
75% Miglyol 812N, 25% бензилового спирта	mAb3	(274 мг белка в композиции; 0,78 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,335 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка с 0,05 мас./мас. трилейцина)
50% Miglyol 812N, 50% бензилового спирта	mAb3	(304 мг белка в композиции; 0,78 мас./мас. содержания белка в композиции с тонкоизмельченным твердым белком; 0,355 мас./мас. композиции с тонкоизмельченным твердым белком в композиции с высокой концентрацией белка с 0,05 мас./мас. трилейцина)

Носители, состоящие из масла и растворителя, смешивали по объему до целевых составов. Носители готовили свежими каждый день, чтобы гарантировать отсутствие потерь растворителя из-за выпаривания.

Высушенный распылением белок взвешивали в круглодонной центрифужной пробирке Eppendorf объемом 2 мл. Соответствующий носитель добавляли по объему к высушенному распылением белку в соответствии с целевой массой твердого вещества на мл носителя.

Высушенный распылением порошок смешивали с носителем путем интенсивного встряхивания (встряхивание, переворачивание и перемешивание, повторение). После встряхивания образец ненадолго помещали в центрифугу для осаждения суспензии от стенок пробирки до дна. Избегали слишком частого центрифугирования, чтобы предотвратить фазовое разделение суспензии. После центрифугирования образец обрабатывали ультразвуком в течение 1-2 мин и при необходимости повторяли процедуру перемешивания.

Суспензии загружали обратно в стеклянный шприц объемом 1 мл, используя либо шпатель для более вязких пастообразных суспензий, либо пипетку для менее вязких суспензий. Для дозирования с использованием Instron расстояние было задано около 10 мм, и, таким образом, было выбрано достаточное количество суспензии, чтобы обеспечить дозирование на расстоянии 10 мм. После загрузки в шприц колпачок с иглы удаляли, а поршень использовали для удаления воздуха и проталкивания суспензии на дно шприца. Это было особенно важно для более вязких суспензий, которые при обратной загрузке шпателем имели тенденцию просто прилипнуть к стенкам цилиндра шприца. Перед дозированием стопор на поршне проверяли на предмет застревания суспензии в выступах стопора в процессе загрузки. Если суспензия застряла в выступах стопора, стопор заменяли на чистый стопор.

Пример 2. Идентификация подходящих систем неводных растворителей, подходящих в качестве носителей для суспензий с высокой концентрацией белка для подкожного введения.

В этом ряде экспериментов все оценки проводились на основе mAb1 в качестве белка-образца и возможности введения через шприц, через стеклянный шприц объемом 1 мл, обеспеченный иглой 27 г TW BD и со скоростью дозирования 4 мм/с. Для предварительной оценки использовался Miglyol 810H. Критерии для соответствующей системы растворителей были основаны на силе при введении через шприц, чистоте (UP-SEC) белка, восстановленного из суспензии в носителе, и использовании компонен-

тов носителя в одобренных FDA продуктах для подкожных инъекций. На основании использования в продуктах, одобренных FDA (табл. 2), N-метил-2-пирролидон и этанол были определены как подходящие растворители.

Таблица 2

Растворитель	Масло	Диапазон концентраций (об./об. растворителя)	Одобренный FDA продукт
Этилацетат	Miglyol 810N	25%-100%	Отсутствует
N-метил-2-пирролидон	Miglyol 810N	25%-100%	Atrigel (0,375 мл N-метил-2-пирролидона);
Этанол	Miglyol 810N	25%-100%	Faslodex (100 мл/мл этанола x 5 мл)

Для изучения силы трения скольжения были оценены двенадцать иллюстративных композиций (фиг. 2). Исследование показало, что чистый растворитель, вероятно, не подходит в качестве носителя из-за коллоидальной нестабильности и нестабильности белка. Все три растворителя показали аналогичное снижение силы при введении через шприц на 25-50% с дополнительным преимуществом этанола и N-метил-2-пирролидона в снижении силы трения скольжения при составе >50%. Максимальный эффект снижения вязкости для смеси этилацетат-Miglyol наблюдался при использовании 25% этилацетата. Небольшое увеличение силы трения скольжения с увеличением расстояния после предельного значения наблюдалось для растворов этилацетата, тогда как устойчивое плато наблюдалось для растворов N-метил-2-пирролидона или этанола и только для Miglyol. На основании силы введения через шприц все три системы растворителей были подходящими. Для этилацетата/Miglyol требовалось не более 25% этилацетата, для N-метил-2-пирролидона или этанола максимальное увеличение концентрации растворителя было оптимальным для уменьшения силы при введении через шприц.

Пример 3. Определение силы при введении через шприц.

Instron использовали для определения силы при введении через шприц, необходимой для дозирования суспензий через стеклянный шприц объемом 1 мл, обеспеченный иглой 27 г TW. Если не указано иное, скорость дозирования составляла 4 мм/с, а сила при введении через шприц была указана как постоянная сила, необходимая для дозирования. Во многих случаях с композициями, приготовленными в соответствии с примером 1, поддерживаемая сила и максимальная сила были эквивалентны - сила отрыва не наблюдалась для способа, которым эти шприцы были загружены.

Первоначальная оценка силы при введении через шприц для различных носителей была выполнена с использованием 100% Miglyol 810N, 100% Miglyol 812N, 100% этанола, 25 об.% бензилового спирта в Miglyol 812N, 75 об.% бензилового спирта в Miglyol 812N, 25 об.% этилолеата в Miglyol 812N, 75 об.% этилолеата в Miglyol 812N, 25 об.% этанола в Miglyol 812N, 75 об.% этанола в Miglyol 812N, 25 об.% этанола в Miglyol 810N, 50 об.% этанола в Miglyol 810N, 75 об.% этанола в Miglyol 810N и 25 об.% этанола с 25 об.% ПЭГ 400 в Miglyol 812N. В то время как Miglyol 810N имел более низкую вязкость, чем Miglyol 812N, Miglyol 812N был предпочтительнее из-за его предыдущего использования в нескольких коммерческих композициях, одобренных FDA. Этанол, бензиловый спирт и этилолеат были одинаково эффективны в снижении силы при введении через шприц для Miglyol 812N (т.е. вязкости) (фиг. 3).

Было обнаружено, что сила при дозировании для композиций с высокой концентрацией белка также зависит от выбора агента, снижающего вязкость, и его концентрации. В одном ряде экспериментов этанол был более эффективным в снижении силы при введении через шприц в суспензиях, чем бензиловый спирт при той же концентрации растворителя (фиг. 4). Вариабельность результатов при одинаковом содержании растворителя может быть связана с неравномерным смешиванием и/или фактическим и целевым содержанием твердых веществ в суспензии.

Кроме того, было обнаружено, что сила при дозировании для композиций с высокой концентрацией белка зависит от концентрации твердого вещества терапевтического белка (фиг. 5). В одном ряде экспериментов суспензии mAb1 в 50 об.% бензилового спирта в Miglyol 812N демонстрировала более высокую силу при дозировании с увеличением концентрации твердого вещества.

Было обнаружено, что сила при дозировании для композиций с высокой концентрацией белка также зависит от свойств порошка, которые могут зависеть от молекул (фиг. 6). Различия в силах при дозировании могут быть связаны с различиями в свойствах порошка молекул и/или размером частиц, полученных сушкой распылением, распределением по размеру и морфологией. В одном ряде экспериментов mAb1, mAb2 и mAb3 в одном и том же носителе (бензиловый спирт+Miglyol (50/50 об./об.)) демонстрировали разные силы при дозировании. mAb2 при концентрации твердого вещества 29% демонстрировало более высокую силу при дозировании, чем mAb1 при концентрации твердого вещества 34%. Таким образом, сила при введении через шприц может зависеть от концентрации твердого вещества в суспензии, свойств порошка, которые могут зависеть от молекул, и носителя (табл. 3).

Таблица 3

Сила при введении через шприц для иллюстративных композиций

Молекула	Носитель	Концентрация суспензии (мас./мас.)	Содержание белка в твердом веществе (мас./мас.)	Плотность суспензии (дозированная масса/объем, г/мл)	Эффективная концентрация белка в суспензии (мг/мл)	Сила при инъекции (Н)*
mAb3	25% ВА	0,335	0,82	1,0 (измерено)	274	54
mAb3	50% ВА	0,355	0,82	1,0 (измерено)	304	43
mAb1	25% ВА	0,291	0,82	1,0 (теоретически)	231	35
mAb1	50% ВА	0,286	0,82	1,0 (теоретически)	232	20,5
mAb1	50% ВА	0,342	0,82	1,0 (теоретически)	278	31
mAb2	50% ВА	0,285	0,82	1,0 (теоретически)	232	27

\*Сила при инъекции 4 мм/с через шприц объемом 1 мл 27 г TW BD Нурак.

Пример 3. Восстановление белка и стабильность.

Восстановление белка и стабильность композиций с высокой концентрацией белка, приготовленных для использования в примере 1, оценивали на предмет долгосрочной стабильности. К суспензии добавляли воду для инъекций (WFI - Water for injection) для достижения общего количества 10 мг/мл или 50 мг/мл, как указано на основании массового процентного содержания белка в суспензии, определенного во время составления, и массы образца суспензии. После добавления WFI к образцу суспензии образец осторожно перемешивали завихрением/переворачиванием, чтобы экстрагировать высушенный распылением белок в водную фазу для растворения. После перемешивания образец центрифугировали для разделения водной и масляной фаз (для Miglyol масло менее плотное, чем вода, и создает верхний слой). Образец из водной фазы удаляли и фильтровали через фильтр 0,22 мкм для удаления любых нерастворимых масляных капель или частиц перед анализом с помощью СВЭЖХ.

В одном ряде экспериментов испытание на физическую стабильность в носителях-суспензиях продемонстрировало, что агрегация является основным наблюдаемым путем разложения (фиг. 7). Композицию mAb1 составляли с использованием порошка mAb1, высушенного распылением, 400-500 мг/мл (81,9% мас./мас. mAb1). Растворение проводили с использованием WFI. Во всех образцах наблюдалось полное извлечение белка. mAb1 было более стабильным в носителях, содержащих бензиловый спирт, чем этанол при данной концентрации растворителя.

В другом ряде экспериментов стабильность суспензии была специфичной для молекулы (фиг. 8). mAb2 не было стабильным в 50% носителе ВА более 1 ч в условиях окружающей среды, несмотря на более низкую концентрацию суспензии; для этого требовалась более высокая сила при дозировании, чем для mAb1 в том же носителе.

На "извлечение белка" влияла как неоднородность суспензии, которая приводит к различию в фактическом и теоретическом содержании белка в образце, так и любая потеря белка из-за необратимого осаждения или захвата в масляной фазе. В целом, этот способ привел к полному извлечению (например,  $\geq 90\%$ ) белка, что позволяет предположить, что способ экстрагирования белка из масляной фазы является подходящим.

Пример 4. Чистота (UP-SEC) и извлечения белка, восстановленного из суспензии в носителе.

Чистоту и извлечение белка для иллюстративных композиций проводили с композициями, содержащими 350 мг/мл mAb1, которые были восстановлены с использованием PBS, pH 7,4, в концентрации 10 мг/мл (табл. 4). N-метил-2-пирролидон не был включен в результаты, поскольку белок необратимо выпадал в осадок при растворении и не был дополнительно проанализирован с помощью UP-SEC. Этилацетат и этанол вызывали агрегацию белка как чистые растворители, но в присутствии 75% Miglyol растворители не вызывали видимого физического разрушения белка (табл. 4). Исходя из чистоты белка в качестве подходящих систем растворителей были выбраны 25% этилацетата/75% Miglyol и 25% этанола/75% Miglyol. Этанол-Miglyol был одной из систем растворителей, удовлетворяющих всем трем критериям оценки.

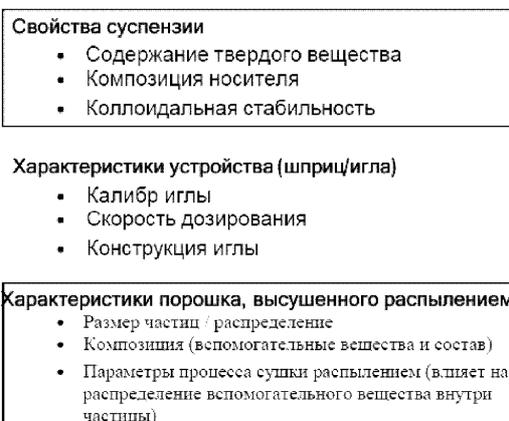
Таблица 4

Носитель	% нативности	% восстановления
WFI	94,6%	95
Miglyol 810N	95,0%	95
Этилацетат	90,0%	90
25% этилацетата, 75% Miglyol	94,0%	121
WFI	95,8%	96
Этанол	91,3%	96
25% этанола/ 75% Miglyol	95,5%	95

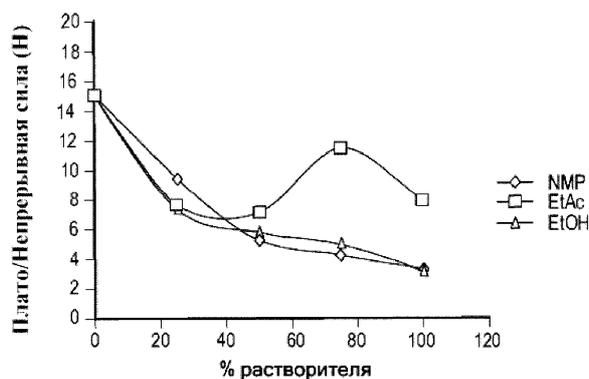
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Неводная композиция с высокой концентрацией белка, содержащая:
  - a) от 200 до 600 мг/мл терапевтического белка в виде композиции с тонкоизмельченным твердым белком,
  - b) гидрофобный агент, содержащий Miglyol 812 или Miglyol 810, и
  - c) агент, снижающий вязкость, выбранный из группы, состоящей из этанола, бензилового спирта, этилацетата, N-метил-2-пирролидона или их комбинаций.
2. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, где композиция с тонкоизмельченным твердым белком получена сушкой распылением.
3. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, в которой указанный агент, снижающий вязкость, представляет собой этанол.
4. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, в которой указанный агент, снижающий вязкость, представляет собой бензиловый спирт.
5. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, где указанный агент, снижающий вязкость, представляет собой этилацетат.
6. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, где указанная композиция с тонкоизмельченным твердым белком имеет растворимость менее 1 мг в 10000 мл в гидрофобном агенте и агенте, снижающем вязкость.
7. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, где указанная композиция с тонкоизмельченным твердым белком находится в форме порошка.
8. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.7, в которой указанный порошок составлен с использованием трилейцина.
9. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.7, в которой массовое соотношение (мас./мас.) указанного порошка и неводной композиции с высокой концентрацией белка составляет более 0,250.
10. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.7, в которой указанный порошок содержит терапевтический белок, углевод, аминокислоту или неионогенное поверхностно-активное вещество.
11. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.10, в которой углевод представляет собой сахарозу, маннит или трегалозу.
12. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.10, в которой аминокислота представляет собой гистидин или пролин.
13. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.10, в которой неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.
14. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.13, в которой полисорбат выбран из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80 или их комбинаций.
15. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.10, в которой концентрация (% мас./мас.) белка составляет по меньшей мере 70%.
16. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, где неводная композиция с высокой концентрацией белка имеет силу трения скольжения при инъекции менее 50 Ньютон (Н), и при этом сила трения скольжения при инъекции представляет собой силу при введении через шприц, необходимая для проталкивания композиции с высокой концентрацией белка через стеклянный шприц с твердым защитным колпачком, имеющий внутренний диаметр 0,25 дюйма, обеспеченный иглой 0,5 дюйма 26½ калибра со скоростью инъекции 4 мм/с.
17. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.16, где сила трения скольжения при инъекции составляет менее 30 Ньютон (Н).
18. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.1, в которой указанный терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело.

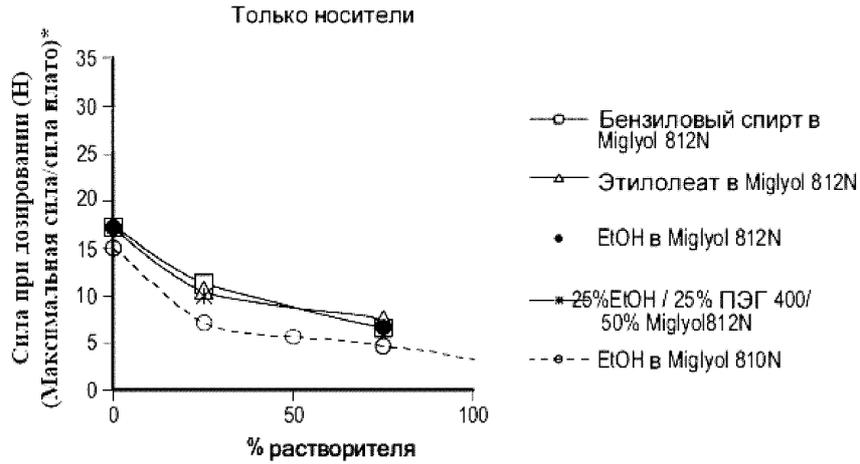
19. Неводная композиция с высокой концентрацией белка, содержащая:
- от 200 до 600 мг/мл терапевтического белка в виде композиции с тонкоизмельченным твердым белком,
  - гидрофобный агент, содержащий Miglyol 812 или Miglyol 810, и
  - бензиловый спирт.
20. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.19, где композиция с тонкоизмельченным твердым белком получена сушкой распылением.
21. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.19, где указанная композиция с тонкоизмельченным твердым белком имеет растворимость менее 1 мг в 10000 мл в гидрофобном агенте и агенте, снижающем вязкость.
22. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.19, где указанная композиция с тонкоизмельченным твердым белком находится в форме порошка.
23. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.22, в которой указанный порошок составлен с использованием трилейцина.
24. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.22, где массовое соотношение (мас./мас.) порошка и неводной композиции с высокой концентрацией белка составляет более 0,250.
25. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.22, в которой указанный порошок содержит терапевтический белок, углевод, аминокислоту или неионогенное поверхностно-активное вещество.
26. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.25, в которой углевод представляет собой сахарозу, маннит или трегалозу.
27. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.25, в которой аминокислота представляет собой гистидин или пролин.
28. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.26, в которой неионогенное поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат.
29. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.28, в которой полисорбат выбран из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80 или их комбинаций.
30. Неводная композиция с высокой концентрацией белка по п.25, в которой концентрация (% мас./мас.) белка составляет по меньшей мере 70%.



Фиг. 1



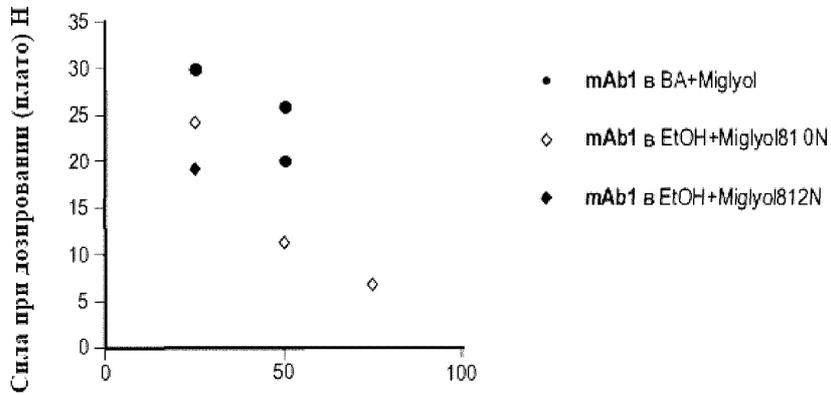
Фиг. 2



\*Максимальная сила и сила плато практически одинаковы

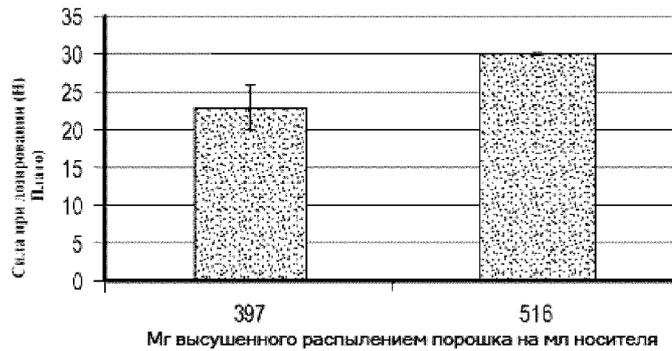
Фиг. 3

Суспензия mAb1: 81,9% содержания белка в высушенном распылением порошке, 390 мг твердого вещества/мл носителя (среднее значение)



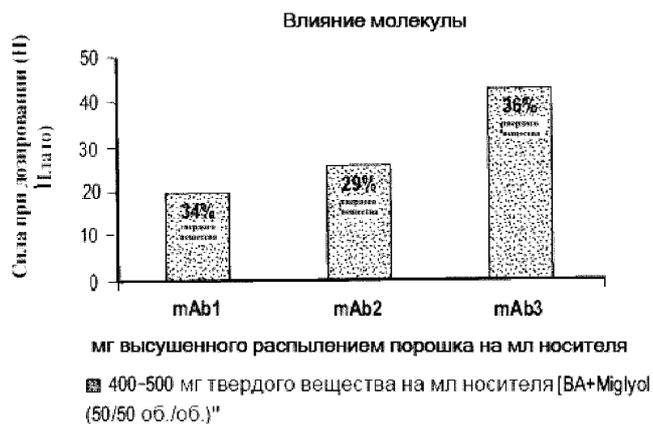
Фиг. 4

Влияние концентрации суспензии

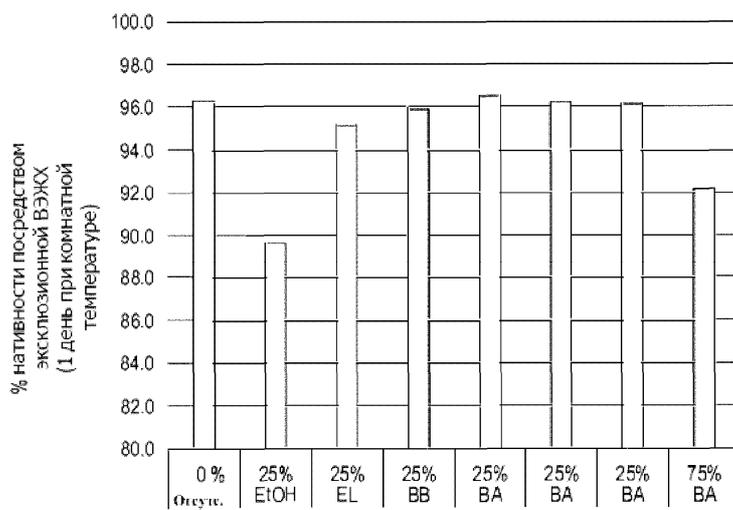


■ mAb1 в BA+Miglyol (50/50 об./об.)

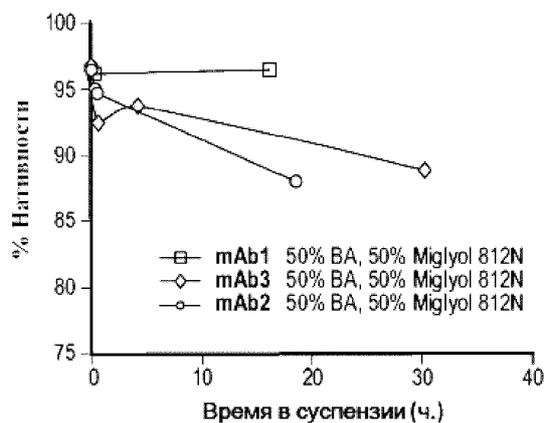
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

