

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047425**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.07.19**

(21) Номер заявки  
**202292264**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.02.04**

(51) Int. Cl. **F26B 5/04** (2006.01)  
**F26B 5/06** (2006.01)  
**F26B 25/22** (2006.01)

---

(54) **ЦЕЛЕВОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ВЛАГИ ДЛЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО  
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА**

---

(31) **62/969,961**

(32) **2020.02.04**

(33) **US**

(43) **2022.09.21**

(86) **PCT/US2021/016569**

(87) **WO 2021/158759 2021.08.12**

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

(72) Изобретатель:  
**Тан Сяолин, Клепп Мэри, Чари  
Рави, Тзул Франко (US)**

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

(56) **US-A1-2014259724  
US-A-5336616  
EP-A1-2916090**

---

(57) Предложены способы лиофилизации для приготовления белковых составов для длительного хранения при комнатной температуре или для повышения стабильности при хранении в холодильнике. В частности, предложены способы лиофилизации для получения целевого процента остаточной влаги в лиофилизированном продукте, такого как 3-5% остаточной влаги. Конечная сушка во время лиофилизации может проводиться в условиях контроля скорости десорбции при температуре, аналогичной температуре полки во время основной сушки. В альтернативном варианте лиофилизацию можно проводить без отдельного этапа конечной сушки.

**B1**

**047425**

**047425 B1**

Заявка на данное изобретение в целом относится к способам лиофилизации белковых составов. В частности, в данном документе предложены процессы лиофилизации для получения целевого процентного содержания остаточной влаги в лиофилизированном лекарственном препарате, который является стабильным при хранении при комнатной температуре или обладает улучшенной стабильностью при хранении в холодильнике.

#### **Уровень техники**

Большинство биофармацевтических составов нестабильны в растворе при длительном хранении из-за различных форм деградации, агрегации или химической модификации. Лيوфилизация, например лиофильная сушка в контролируемых условиях, является предпочтительным способом преобразования биофармацевтических составов, таких как белковые составы, в твердое состояние для повышения стабильности продукта при длительном хранении. Лيوфилизированный продукт, например таблетку, предпочтительно хранить при температуре около 2-8°C и/или при комнатной температуре в течение относительно длительного периода времени. Также может быть желательным, чтобы таблетка более относительно сохраняла стабильность при хранении при комнатной температуре, чтобы исключить потребность в охлаждении белкового лекарственного препарата поздней фазы во время коммерческой транспортировки и хранения по всему миру, особенно в местах, в которых электричество и охлаждение могут быть ненадежными.

Лيوфилизация является относительно дорогим процессом, требующим длительного времени воздействия. Ключевые цели оптимизации процессов лиофилизации могут включать оптимизацию процесса без риска разрушения продукта; определение кажущейся конечной точки основной сушки и оптимизацию конечной сушки для достижения желаемого содержания остаточной влаги в лиофилизированных продуктах. Оптимизация цикла лиофильной сушки для данного биофармацевтического состава требует сбалансированного понимания процесса лиофилизации, характеристик состава, возможностей оборудования и практических рисков, связанных с параметрами процесса. (Chang et al., 2004, American Association of Pharmaceutical Scientists, pages 113-138, Freezing-drying process development for protein pharmaceuticals, Lyophilization of Biopharmaceuticals).

Следует понимать, что существует потребность в способах лиофилизации, позволяющих получать лиофилизированные продукты, обладающие стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре или улучшенной стабильностью при хранении в холодильнике.

#### **Сущность изобретения**

Лيوфилизация часто является предпочтительным способом преобразования биофармацевтических составов в твердое состояние для длительного хранения. Лيوфилизированную таблетку можно предпочтительно хранить при комнатной температуре в течение относительно длительного периода времени. В данном документе предложен способ лиофилизации для получения целевого процента остаточной влаги лиофилизированного продукта, который обладает повышенной стабильностью при длительном хранении продукта при комнатной температуре или улучшенной стабильностью при хранении в холодильнике.

Стандартный способ приготовления лиофилизированной таблетки включает помещение состава в камеру лиофилизатора, например размещение состава в емкостях/флаконах на полках камеры лиофилизации в лиофилизаторе; замораживание состава, например, при низкой температуре полки ниже -30°C; проведение основной сушки состава для удаления молекулы замороженного растворителя путем сублимации, при этом основную сушку выполняют при температуре полки лиофилизатора, которая является относительно низкой температурой полки, например обычно равной или ниже около 0°C, в условиях высокого вакуума, обычно таких как давление в камере ниже 200 мТорр; и проведение конечной сушки состава для удаления десорбированных молекул растворителя для получения целевого массового процента молекул растворителя в лиофилизированной таблетке, при этом конечная сушка проводится при относительно высокой температуре полки 25°C или выше в условиях высокого вакуума, например ниже 200 мТорр давления в камере.

В данном раскрытии предложен способ приготовления лиофилизированной таблетки, включающий приготовление состава, при этом состав содержит по меньшей мере одну молекулу растворителя и пептид или белок; лиофилизацию состава с получением лиофилизированной таблетки, включающей (a) помещение состава в камеру лиофилизатора, например размещение состава в емкостях/флаконах на полках камеры лиофилизации в лиофилизаторе, (b) замораживание состава, (c) проведение первичной сушки состава, например основной сушки, для удаления по меньшей мере одной молекулы замороженного растворителя путем сублимации, при этом первичную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже около 0°C, и (d) проведение дополнительной сушки состава, например конечной сушки, для удаления по меньшей мере одной молекулы растворителя для получения целевого массового процента по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке, при этом конечную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже около 0°C. В некоторых вариантах реализации данного изобретения отсутствует отдельная конечная сушка. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения целевой массовый процент по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке составляет

около 3-5%, около 4% или около 4,5%.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, по меньшей мере, одна молекула растворителя в составе представляет собой молекулу воды. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения пептид или белок в составе по данному изобретению представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственный препарат. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения лиофилизированная таблетка, полученная с использованием способа по данной заявке, стабильна в условиях хранения при комнатной температуре или имеет улучшенную стабильность при хранении в холодильнике.

В некоторых аспектах целевое массовое процентное содержание по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке по данному изобретению регулируется температурой полки лиофилизатора во время дополнительной сушки с регулируемой скоростью сушки. В некоторых аспектах целевое массовое процентное содержание по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке по данному изобретению регулируется продолжительностью дополнительной сушки.

В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки, например вторичной сушки, может быть такой же, как температура полки лиофилизатора во время первичной сушки, например основной сушки. В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки может быть выше, чем температура полки лиофилизатора во время первичной сушки. В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки может быть ниже, чем температура полки лиофилизатора во время первичной сушки. В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки равна или немного превышает температуру полки лиофилизатора во время первичной сушки.

В некоторых аспектах способ по данному изобретению дополнительно включает определение окончания первичной сушки на основании изменения давления в камере лиофилизатора. В некоторых аспектах температура лиофилизированной таблетки является ниже температуры разрушения лиофилизированной таблетки при первичной сушке.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения состав по данному изобретению дополнительно содержит буфер, эксципиент, стабилизатор, криопротектор, объемообразующий агент, пластификатор или их комбинацию; при этом стабилизатор представляет собой полиол, сахарозу, маннит, трегалозу, сорбит, аминокислоту или их комбинацию; при этом криопротектор представляет собой поверхностно-активное вещество, сахар, соль, аминокислоту или их комбинацию. В некоторых аспектах буфер содержит ацетат и/или гидрохлорид гистидина, буфер имеет значение pH около 5,3 или около 6, а эксципиент представляет собой полисорбат 80. В некоторых аспектах стабилизатор представляет собой сахарозу, при этом соотношение сахарозы к пептиду или белку составляет около 1:1, около 3:1, около 10:1 или от около 1:1 до около 10:1.

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

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

На фиг. 1 представлены измерения давления в камере в процессах лиофилизации, как указано в Patel et al. Давление в камере, измеренное емкостным манометром, давление в камере, измеренное вакуумметром Пирани, и заданное значение давления в камере (заданное значение вакуума) наносили на график в зависимости от времени сушки в соответствии с Patel et al.

На фиг. 2 представлены стандартные процессы лиофилизации, включающие три этапа, например замораживание, основную сушку и конечную сушку. Стандартная лиофилизация проводится в три этапа, включая замораживание при температуре полки около  $-45^{\circ}\text{C}$ , основную сушку при температуре полки около  $-20$  или около  $-25^{\circ}\text{C}$  и конечную сушку при более высокой температуре, например при температуре полки около  $40^{\circ}\text{C}$ . Обычно температура полки при конечной сушке, например, около  $40^{\circ}\text{C}$  всегда значительно выше температуры полки при основной сушке, например, около  $-20$  или  $-25^{\circ}\text{C}$ .

На фиг. 3 представлен уникальный процесс лиофилизации по данному изобретению путем проведения конечной вторичной сушки при контроле скорости десорбции для достижения целевого процента содержания остаточного растворителя в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Конечная сушка по данному изобретению рассматривается как продолжение основной сушки, которую проводят при: низкой температуре, такой как температура, равная температуре полки при основной сушке; температуре немного выше температуры полки при основной сушке; или температуре, которая ниже температуры полки при основной сушке; в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. В некоторых аспектах отсутствует отдельная конечная сушка.

На фиг. 4 представлено использование разницы между измерениями вакуумметра Пирани (ВП) и емкостного манометра (ЕМ), например ВП-ЕМ, в качестве индикаторов для определения кажущейся конечной точки основной сушки, например начала, середины и завершения, что свидетельствовало о завершении сублимации льда в процессах лиофилизации в соответствии с Patel et al. и иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Измерения ВП-ЕМ, соответствующие соответствующему процентному содержанию остаточной влаги в образцах, были указаны на фигуре в соответствии с Patel et al. и иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На фиг. 5 представлены скорость десорбции после завершения сублимации в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Конечная сушка проводилась при той же температуре полки, что и во время основной сушки, путем продления основной сушки при температурах полки 0, -10, -20 или -30°C, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. В некоторых аспектах отсутствовала отдельная конечная сушка.

На фиг. 6 представлены температуры стеклования лиофилизированных белковых составов, соответствующие процентам содержания остаточной влаги, включая рекомендуемые температуры хранения в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На фиг. 7 представлены измерения давления в камере в процессах лиофилизации с увеличенной продолжительностью, измеренные с помощью емкостного манометра (ЕМ) и вакуумметра Пирани (ВП) в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Давление в камере наносили на график в зависимости от времени сушки в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Разницу между ВП и ЕМ, например, (ВП-ЕМ), использовали для определения точки завершения основной сушки в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На фиг. 8 представлены скорости десорбции после завершения сублимации льда при температуре полки -20 или -30°C с увеличенной продолжительностью основной сушки в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Полученное содержание влаги наносили на график в зависимости от продолжительности от момента завершения в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

#### **Подробное описание сущности изобретения**

Лиофилизация представляет собой распространенный способ приготовления и производства белковых фармацевтических препаратов. Лиофилизация, например, лиофильная сушка, может быть использована для удаления льда или других замороженных растворителей из белкового состава посредством сублимации и для удаления молекул связанной воды посредством десорбции. Существуют различные проблемы при выборе критических параметров процесса для разработки процессов лиофилизации. Стандартная лиофилизация белковых составов может выполняться в три этапа, например, замораживание, основная сушка (сублимация) и конечная сушка (десорбция), например замораживание при температуре около -45°C, основная сушка при температуре около -20°C и конечная сушка при более высокой температуре около 40°C, около 35-55°C или около 25-55°C. Высушенный продукт белкового состава после завершения основной сушки все еще содержит около 5-10% влаги из-за наличия молекул связанной воды, которые присоединены к продуктам. Стандартная конечная сушка обычно проводится при гораздо более высоких температурах, чем температура основной сушки, для достижения содержания остаточной влаги менее чем около 1 или около 2%, например сушка при температуре около 40°C, около 35-55°C или около 25-55°C.

В данном документе предложен уникальный процесс лиофилизации, который существенно отличается от стандартных процессов лиофилизации. Например, в данной заявке предложен уникальный процесс лиофилизации путем проведения конечной сушки с регулируемой скоростью десорбции для достижения целевого массового процента остаточной влаги около 4,0%, около 4,5% или около 3-5%. Конечную сушку по данному изобретению можно рассматривать как продолжение основной сушки, которую можно проводить с регулируемой скоростью десорбции при температуре, равной температуре полки при основной сушке, при температуре, которая немного выше температуры полки при основной сушке или при температуре ниже температуры полки при основной сушке. В одном аспекте температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки равна или немного превышает температуру полки лиофилизатора во время первичной сушки. В альтернативном варианте лиофилизацию можно проводить без отдельного этапа конечной сушки. Лиофилизация по данному изобретению существенно отличается от стандартной лиофилизации, поскольку конечную сушку по данному изобретению можно проводить при более низкой температуре, которая значительно ниже, чем температура проведения стандартной конечной сушки.

Существуют различные проблемы при выборе критических параметров процесса для разработки процессов лиофилизации, например, проведения замораживания, основной сушки и конечной сушки. Критические параметры процесса лиофилизации в первую очередь определяются физико-химическими характеристиками составов продукта, такими как температура разрушения и/или температура стеклования в замороженном состоянии ( $T_g'$ ) состава продукта. Процесс сушки можно строго контролировать во время процесса лиофилизации, чтобы избежать изменений внешнего вида и

характеристик высушенных продуктов, поддерживая температуру препарата на благоприятных низких температурах во время этапа замораживания и основной сушки. Например, процессы сушки, включая температуру полки, давление в камере, продолжительность и скорость линейного изменения каждого этапа процесса, можно строго контролировать во время процесса лиофилизации. В данном документе предложены способы достижения целевого содержания влаги в лиофилизированном продукте путем регулирования температуры полки и продолжительности конечной сушки.

Этап замораживания процесса лиофилизации включает замораживание состава продукта для получения твердой матрицы для сушки. Иногда этап замораживания может включать дополнительный этап "отжига" (Chang et al.) или контролируемый этап нуклеации (Fang et al., Effect of Controlled Ice Nucleation on Stability of Lactate Dehydrogenase During Freeze-Drying, J. Pharm. Sci. 2018 March, 107(3):824-830). Этап основной сушки процесса лиофилизации включает удаление замороженного растворителя, такого как лед, посредством сублимации путем снижения давления при поддержании температуры продукта на низком целевом уровне. Процесс сублимации относится к переходу вещества из твердой фазы (например, льда) в газообразную фазу (например, пар) напрямую, минуя жидкую фазу (например, воду). Обычно для возникновения сублимации требуется низкое давление. Сублимация, например, эндотермический процесс, происходит при температурах и давлениях ниже тройной точки вещества на фазовой диаграмме, соответствующей самому низкому давлению, при котором вещество может существовать в виде жидкости. Кроме того, поскольку сублимация является эндотермическим фазовым переходом, необходимо подвода тепловой энергии к замороженным веществам, что обеспечивается за счет регулирования температуры полки лиофилизации выше температуры продукта во время основной сушки. Температуру продукта регулируют так, чтобы она была на несколько градусов ниже температуры разрушения ("коллапса") (или Tg'), путем регулирования как температуры полки, так и давления в камере. Этап конечной сушки в процессе лиофилизации включает удаление связанной воды путем десорбции для достижения желаемого содержания остаточной влаги на целевом уровне. В процессе сушки конденсатор удерживают при низкой температуре (например, ниже -50°C) и низком давлении для эффективного преобразования и улавливания сублимированного растворителя в твердом состоянии.

Оборудование для лиофильной сушки может включать систему охлаждения, вакуумную систему, систему управления, камеру для продукта и конденсатор. Температуру полки камеры для продукта лиофилизатора необходимо надлежащим образом контролировать для проведения основной и конечной сушки. Во время этапа основной сушки процесса лиофилизации давление в камере лиофилизатора может быть снижено до уровня ниже давления насыщенного пара замороженного растворителя при температуре замороженного продукта путем создания вакуума. Этап основной сушки можно считать завершенным, когда все или практически все замороженные растворители удаляются путем сублимации. Если после завершения этапа основной сушки в составе продукта остаются связанные незамерзшие растворители, то их можно удалить путем десорбции при гораздо более высоких температурах во время конечной сушки во время стандартного процесса лиофилизации. (Chang et al.)

Кажущаяся конечная точка основной сушки (сублимации), например начала, середины и окончания давления в камере ВП (вакуумметр Пирани), может быть определена различными способами, такими как сравнительное измерение давления (с помощью вакуумметра Пирани по сравнению с измерением с помощью емкостного манометра), измерение точки конденсации, газо-плазменная спектроскопия, измерение концентрации водяного пара, измерение давления в конденсаторе, "тест" повышение давления или термодинамика продукта (Patel et al., Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control, AAPS PharmSciTech, Vol. 11, No. 1, March 2010). Вакуумметр Пирани измеряет теплопроводность газа в камере. Во время лиофилизации давление в камере можно контролировать с помощью емкостного манометра, измеряющего абсолютное давление в камере. Вакуумметр Пирани показывает на около 60% больше, чем емкостной манометр во время основной сушки, в то время как практически весь газ в камере представляет собой водяной пар, поскольку теплопроводность водяного пара в около 1,6 раза больше теплопроводности азота. Когда давление, измеренное вакуумметром Пирани, начинает резко снижаться, например, в точке начала процесса, это указывает на изменение композиции газа от преимущественно водяного пара до азота, что может указывать на окончание основной сушки (Patel et al.). Например, изменения давления в камере, измеренного с помощью ВП, могут зависеть от содержания влаги. Давление в камере, измеренное емкостным манометром, давление в камере, измеренное манометром Пирани, и заданные значения давления в камере (заданное значение вакуума) нанесены на график в зависимости от времени сушки, как представлено на фиг. 1 (в соответствии с фиг. 7 в Patel et al.). Процентное содержание остаточной влаги измеряют гравиметрическим способом и/или способом Карла Фишера.

Обычно процессы лиофилизации включают три этапа, например замораживание, основную сушку и конечную сушку при более высокой температуре. Например, как представлено на фиг. 2, стандартная лиофилизация может быть проведена в три этапа, включая замораживание при температуре полки около -45°C в течение не менее 120 мин, основную сушку при температуре полки около -20°C в течение 1-3 дней и конечную сушку при более высокой температуре, например около 40°C. В стандартных

процессах лиофилизации объемная вода может быть удалена путем сублимации в вакууме во время основной сушки при низкой температуре, например в диапазоне от около  $-10$  до около  $-35^{\circ}\text{C}$  температуры полки или от около  $-40$  до около  $-45^{\circ}\text{C}$  температуры полки. Во время конечной сушки связанная незамерзшая вода, оставшаяся в продукте, может быть удалена путем быстрой десорбции при высокой температуре, например при температуре полки около  $40^{\circ}\text{C}$ , как представлено на фиг. 2. Обычно содержание остаточной влаги в лиофилизированном продукте может достигать менее около 1% при применении стандартной конечной сушки при высокой температуре. Как правило, содержание остаточной влаги в лиофилизированном продукте можно снизить за счет повышения температуры полки и продолжительности конечной сушки.

В данном документе предложен уникальный процесс лиофилизации, существенно отличающийся от стандартных процессов лиофилизации, путем проведения конечной сушки с регулируемой скоростью десорбции для достижения целевого процентного содержания остаточного растворителя. В некоторых вариантах реализации данного изобретения отсутствует отдельная конечная сушка. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения конечная сушка процесса лиофилизации по данному изобретению может проводиться при контролируемой скорости десорбции для достижения целевого массового процента остаточной влаги лиофилизированных продуктов, такого как около 4,0%, около 4,5% или около 3-5%. В некоторых аспектах конечная сушка в процессе лиофилизации по данному изобретению может проводиться при контролируемой скорости десорбции, при этом температура полки во время конечной сушки в процессе лиофилизации по данному изобретению может быть намного ниже, чем температура полки во время стандартной конечной сушки. Например, конечную сушку по данному изобретению можно рассматривать как продолжение основной сушки, которую проводят при низкой температуре, такой как около  $-20^{\circ}\text{C}$ , в диапазоне от около  $-10$  до около  $-30^{\circ}\text{C}$ , в диапазоне от около 0 до около  $-30^{\circ}\text{C}$ , при температуре, которая является такой же, как температура полки во время основной сушки, при температуре, которая немного выше, чем температура полки во время основной сушки, или при температуре, которая немного ниже температуры полки во время основной сушки, как представлено на фиг. 3. Напротив, стандартную конечную сушку проводят при высокой температуре, такой как около  $40^{\circ}\text{C}$ , или в диапазоне от около  $35$  до около  $55^{\circ}\text{C}$ .

Во время основной сушки фронт сублимации движется через продукт, чтобы осадить высушенный продукт, например, таблетку, над границей раздела поверхности льда и сублимировать кристаллы льда. Желаемая таблетка имеет в основном однородный вид с небольшими отслаиваниями или крошением вдоль поверхностей или краев. Высушенный продукт белкового состава после завершения сублимации может иметь 5-10% влаги за счет наличия связанных молекул воды, которые присоединены к продуктам. В целом замороженные продукты по структуре можно разделить на кристаллические или аморфные стекловидные. Было обнаружено, что температуры стеклования ( $T_g'$ ) замороженного продукта сильно коррелируют с температурой разрушения ( $T_c$ ) лиофилизированной таблетки во время основной сушки. Температуру стеклования можно рассматривать как область температур, при которой высушенный продукт переходит из жесткого стеклообразного состояния в пластичное каучукоподобное состояние с более высокой подвижностью. Целостность структуры таблетки может поддерживаться в стекловидном состоянии с незначительной подвижностью, когда температура продукта поддерживается ниже  $T_g'$ . Важно поддерживать температуру продукта во время основной сушки ниже  $T_g'$  белкового состава, чтобы предотвратить разрушение таблетки. (Chang et al.) Когда таблетка становится мягкой, ее структуру часто невозможно сохранить.

Желательно, чтобы таблетка не имела признаков разрушения или обратного плавления во время лиофильной сушки. Желаемая подходящая таблетка имеет жесткую микроскопическую структуру и не должна разрушаться, обесцвечиваться и обратно плавиться. Разрушение (или частичное разрушение) таблетки может быть связано с эвтектическим плавлением кристаллических агентов в составе продукта (на границе зоны сублимации льда) во время основной сушки. Желательно поддерживать температуру продукта ниже температуры эвтектического плавления кристаллических компонентов состава продукта во время основной сушки (Chang et al.). Обратное плавление таблетки можно рассматривать как форму частичного или полного разрушения таблетки, вызванного неполной сублимацией льда при основной сушке. Температура продукта коррелирует с давлением пара на границе зоны сублимации льда. Давление пара зависит от скорости передачи тепла продукту, контролируемой температурой полки и заданным значением уровня вакуума в системе. Целевую температуру продукта можно поддерживать должным образом, контролируя температуру полки и уровень вакуума (давление) в системе во время основной сушки.

В одном варианте реализации данного изобретения способ включает этапы получения водного образца, содержащего белок и эксципиент, в емкости. Емкость может представлять собой флакон, стеклянный флакон, цилиндр шприца или двухкамерный автоинъектор. Емкость может быть достаточно открытой для дегазации водяного пара. Емкость, содержащая водной образец, помещают в камеру, и тепло может быть отведено от образца для достижения первой температуры, при которой в образце образуются кристаллы льда. Воздух может быть удален из камеры для достижения первого давления. Затем к образцу можно подвести тепловую энергию для достижения второй температуры, позволяющей

удалить воду из образца путем сублимации. Остаточная вода может оставаться захваченной в образце после сублимации, и ее можно удалить на этапе дополнительной сушки. В одном аспекте во время этапа начального замораживания и основной сушки тепло может отводиться от водного образца со скоростью около 0,5°C/мин. В одном аспекте первая температура составляет около -45°C.

Экспципент представляет собой компонент, добавляемый вместе с активным лекарственным веществом в фармацевтический состав. Экспципенты могут помочь стабилизировать лекарственное вещество и/или увеличить объем состава. Термин "компонент" может использоваться взаимозаменяемо с экспципентами. Экспципенты включают различные вещества для различных целей, таких как буферизация, увеличение объема, солюбилизация, стабилизация, пластификация и защита лекарственного вещества. Вещества-протекторы могут защитить от термического стресса и/или физического стресса, такого как перемешивание. Криопротекторы могут защитить белок от стрессов, возникающих при замораживании, таких как стресс на поверхности льда и стресс при концентрации вымораживанием. Лиопротекторы могут защитить белок от стрессов при замораживании и дегидратации. Экспципенты могут содержать стабилизаторы. Стабилизатор может быть добавлен к предварительно лиофилизированному раствору, чтобы стабилизировать белок от агрегации или другой деградации. Стабилизация может происходить за счет контроля динамики стекловидных структур в процессе лиофилизации или за счет сохранения нативной структуры белка за счет специфического взаимодействия стабилизатора с белком.

Потребность в создании биофармацевтических составов, устойчивых к длительному хранению при комнатной температуре, привела к увеличению потребности в разработке процессов лиофилизации. В данном раскрытии предложены способы удовлетворения вышеупомянутых потребностей путем предоставления способов лиофилизации биофармацевтических составов для получения лиофилизированных продуктов, которые имеют желаемые характеристики и содержание остаточной влаги.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутые потребности, предлагая процессы лиофилизации для получения целевого процентного содержания остаточной влаги в лиофилизированном продукте, который является стабильным при хранении при комнатной температуре или обладает улучшенной стабильностью при хранении в холодильнике.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий "по меньшей мере один"; и термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, понятные специалистам в данной области техники; и в случаях, когда указаны диапазоны, конечные точки включены в него.

Используемые в контексте данного документа термины "включать", "включает" и "включающий" не имеют ограничительного характера и их следует понимать как означающие "содержать", "содержит" и "содержащий" соответственно.

В некоторых вариантах реализации данного изобретения в данном раскрытии предложен способ приготовления лиофилизированной таблетки, включающий приготовление состава, при этом состав содержит по меньшей мере одну молекулу растворителя и пептид или белок; лиофилизацию состава с получением лиофилизированной таблетки, включающей (a) помещение состава в камеру лиофилизатора, например размещение состава в емкостях/флаконах на полках камеры лиофилизации в лиофилизаторе, (b) замораживание состава, (c) проведение первичной сушки (основной сушки) состава для удаления по меньшей мере одной молекулы замороженного растворителя путем сублимации, при этом первичную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже 0°C, и (d) проведение дополнительной сушки (конечной сушки) состава для удаления по меньшей мере одной молекулы растворителя для получения целевого массового процента по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке, при этом конечную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже 0°C. В альтернативном варианте лиофилизацию можно проводить без отдельного этапа конечной сушки.

Используемый в контексте данного документа термин "сублимация" относится к явлению лиофилизации (лиофильной сушки), когда молекулы воды (молекулы растворителя) переходят непосредственно из твердого состояния (льда) в парообразное состояние, минуя жидкое состояние. Во время лиофилизации продукт замораживают и помещают в вакуум, что позволяет льду переходить непосредственно из твердого состояния в парообразное, минуя жидкое состояние. Сублимация представляет собой эндотермический процесс, происходящий при температурах и давлениях ниже тройной точки вещества на фазовой диаграмме, соответствующей наименьшему давлению, при котором вещество может существовать в виде жидкости. Сублимация воды может происходить при давлениях и температурах ниже тройной точки, например 4,579 мм рт. ст. и 0,0099°C. Скорость сублимации льда из замороженного продукта зависит от разницы в давлении пара продукта на границе зоны сублимации льда по сравнению с давлением пара в камере лиофилизации, которое обычно немного выше или равно давлению в холодильной ловушке (Nireesha et al., Lyophilization/freeze drying-an review, International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences, page 87-98, volume 3, No. 4, October, 2013; Chang et al.).

Скорость сублимации льда из замороженного продукта также зависит от сопротивления сухой таблетки переносу пара с поверхности сублимации льда.

Используемый в контексте данного документа термин "лиофилизатор" относится к системе, содержащей (a) камеру для лиофилизации с полками, куда загружаются нагруженные флаконы для проведения лиофилизации, (b) конденсатор для захвата сублимированного водяного пара в виде льда, (c) блок охлаждения и нагрева, облегчающий контроль температуры, и (d) вакуумный насос, который может снижать давление в камере до значений ниже атмосферного. Давление в камере лиофилизатора поддерживается на заданном уровне за счет контролируемого введения инертного, сухого сдувочного газа (обычно газообразного азота). В большинстве случаев камера лиофилизации отделена от конденсатора главным клапаном. Флаконы с продуктом загружаются на полки камеры с контролируемой температурой полок (Chang et al.).

Используемый в контексте данного документа термин "пептид" или "белок" включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как "пептид" или "полипептиды". Белок может содержать один или более полипептидов для формирования одной функционирующей биомолекулы. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

В одном аспекте пептид или белок в составе по данному изобретению представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственный препарат.

Используемый в контексте данного документа термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (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 имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена ( $C_L$ ). Области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изоформа или подкласса. Термин "антитело" включает, но не ограничивается ими, антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

Используемый в контексте данного документа термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, dsFv-фрагмент, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и изолированную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триантела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты 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. Фрагмент антитела может быть получен различными способами. 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. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела необязательно может содержать фрагмент одноцепочечного антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела необязательно может содержать мультимолекулярный комплекс.

Используемый в контексте данного документа термин "конъюгат антитело-лекарственный препарат" или "ADC" может относиться к антителу, присоединенному к биологически активному лекарственному препарату (препаратам) с помощью линкера (линкеров) с лабильной связью (связями). ADC может содержать несколько молекул биологически активного лекарственного препарата (или нагрузок), которые могут быть ковалентно связаны с боковыми цепями аминокислотных остатков антитела (Siler Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, 6 mAbs 34-45 (2013)). Антитело, используемое для ADC, может быть способно связываться с достаточной



аффинностью для селективного накопления и длительного удержания в сайте-мишени. Большинство ADC могут иметь значения  $K_d$  в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь активность в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может достигать внутриклеточных концентраций, достижимых после распределения ADC в ткани-мишени. И наконец, линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть достаточно стабильным в циркуляции, чтобы использовать преимущества фармакокинетических свойств фрагмента антитела (например, длительный период полувыведения) и позволить полезной нагрузке оставаться прикрепленной к антителу по мере его распределения в тканях, но должен обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного препарата после того, как ADC может быть поглощен клетками-мишенями. Линкер может представлять собой: линкер, который не расщепляется во время клеточного процессинга, и линкер, который расщепляется, когда ADC достигает сайта-мишени. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активный лекарственный препарат, высвобождаемый в ходе распознавания, содержит полезную нагрузку и все элементы линкера, все еще присоединенные к аминокислотному остатку антитела, обычно к остатку лизина или цистеина, после полного протеолитического расщепления ADC внутри лизосомы. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает сайт расщепления между полезной нагрузкой и сайтом присоединения аминокислоты на антителе. Механизмы расщепления могут включать гидролиз кислотолабильных связей в кислых внутриклеточных компартментах, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой и восстановительное расщепление дисульфидных связей восстановительной средой внутри клеток.

Используемый в контексте данного документа термин "белковый фармацевтический препарат" включает активный компонент, который может быть полностью или частично биологическим по своей природе. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белковый фармацевтический препарат может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, антиген, вакцину, конъюгат пептид-лекарственный препарат, конъюгат антитело-лекарственный препарат, конъюгат белок-лекарственный препарат, клетки, ткани или их комбинации. В некоторых других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белковый фармацевтический препарат может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, конъюгата пептид-лекарственный препарат, конъюгата антитело-лекарственный препарат, конъюгата белок-лекарственный препарат, клеток, тканей или их комбинаций.

#### **Иллюстративные варианты реализации данного изобретения**

В описанных в данном документе вариантах реализации данного изобретения предложены композиции и способы для проведения лиофилизации для получения целевого процентного содержания остаточной влаги в лиофилизированном продукте, который является стабильным при хранении при комнатной температуре или имеет улучшенную стабильность при хранении в холодильнике.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в данном раскрытии предложена лиофилизированная таблетка, которая имеет целевой массовый процент по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке, который составляет около 3-6%, около 4%, около 4,5%, около 2-5,5%, около 2,5-6%, около 3-4,5%, около 3,5-6,5%, около 4-5%, около 4,1%, около 4,2%, около 4,3%, около 4,4%, около 4,6%, около 4,7%, около 4,8% или около 4,9%.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения температура полки лиофилизатора во время проведения дополнительной сушки может быть такой же, как температура полки лиофилизатора первичной сушки (основной сушки). В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки (конечной сушка) может быть немного выше, чем температура полки лиофилизатора во время первичной сушки. В некоторых аспектах температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки может быть ниже температуры полки лиофилизатора во время первичной сушки. В некоторых аспектах разница между температурой полки лиофилизатора во время дополнительной сушки и температурой полки лиофилизатора во время первичной сушки может составлять около 0-25°C, около 0-20°C, около 0-15°C, около 0-10°C, около 0-5°C, около 0-3°C, около 0-2°C, около 1°C, около 2°C, около 3°C, около 4°C, около 5°C, около 6°C, около 7°C, около 8°C, около 9°C или около 10°C.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данному изобретению дополнительно включает определение окончания первичной сушки (основной сушки) на основании изменения давления в камере лиофилизатора, измеренного с помощью ВП. В некоторых аспектах изменения давления в камере лиофилизатора измеряются с помощью вакуумметра Пирани и/или емкостного манометра. Разность измерений, полученных с помощью вакуумметра Пирани (ВП) и емкостного манометра (ЕМ), например ВП-ЕМ, используется как индикатор для определения окончания первичной сушки или окончания конечной сушки. В некоторых аспектах давление в камере лиофилизатора может поддерживаться при стандартных условиях около 100 мТорр или других стандартных условиях, таких как 50 или 200 мТорр.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения состав по данному

изобретению подвергают лиофилизации для получения лиофилизированной таблетки путем помещения состава в камеру лиофилизатора. Состав можно переносить во флаконы, например, стеклянные флаконы, затем флаконы помещают в камеру лиофилизатора. Глубина заполнения флакона составляет около 1 см, около 1,5 см, около 0,8 см, около 0,9 см, около 1,1 см, около 1,2 см, около 1,3 см, около 1,4 см, около 1,6 см, около 1,7 см, около 1,8 см, около 1,9 см или около 2 см. Размер стеклянного флакона составляет около 2 мл, около 5 мл, около 10 мл, около 20 мл, около 6 мл, около 7 мл, около 8 мл, около 9 мл, около 15 мл, около 25 мл, около 30 мл, около 40 мл или около 50 мл. Загрузка стеклянных флаконов в лиофилизатор может быть полной или частичной.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения состав по данному изобретению дополнительно содержит буфер, эксципиент, стабилизатор, криопротектор, лиопротектор, объемообразующий агент, пластификатор или их комбинацию; при этом стабилизатор представляет собой полиол, сахарозу, маннит, трегалозу, сорбит, аминокислоту или их комбинацию; при этом криопротектор или лиопротектор представляет собой поверхностно-активное вещество, сахар, соль, аминокислоту или их комбинацию. В некоторых аспектах буфер содержит ацетат или гидрохлорид гистидина, буфер имеет значение pH около 5,3, а эксципиент представляет собой полисорбат 80. В некоторых аспектах стабилизатор может представлять собой сахарозу, при этом соотношение сахарозы к пептиду или белку составляет около 1:1, например, состав содержит 50 мг/мл сахарозы и 50 мг/мл белка. Некоторые составы содержат сахарозу и белок в соотношении около 1:1, около 3:1, около 10:1 или от около 1:1 до около 10:1. В некоторых аспектах стабилизаторы включают глицерин, маннит, трегалозу, сорбит, сахарозу, гидрохлорид аргинина, аланин, пролин, глицин, хлорид натрия или их комбинацию. В некоторых аспектах стабилизатор составляет от около 19,9 до около 82,2% массы лиофилизированной таблетки. В некоторых аспектах стабилизатор представляет собой сахарозу, и стабилизатор составляет от около 3 до около 15%, предпочтительно около 5-11%, 4-7,5% или 5-7,5% массы лиофилизированной таблетки, в зависимости от наличия других компонентов стабилизатора и количества белка, воды и других эксципиентов. В одном аспекте соотношение белка к стабилизатору по массе составляет от 1:1 до 3:1, предпочтительно от 1,2:1 до 2:1, более предпочтительно около 1,5:1. В некоторых аспектах эксципиент содержит поверхностно-активное вещество, например, от около 0,01 до около 0,96% поверхностно-активного вещества. Поверхностно-активное вещество содержит неионогенный детергент, такой как сложный эфир полиэтокселированного сорбитана и жирной кислоты. В некоторых аспектах фармацевтически приемлемую лиофилизированную таблетку готовят из предварительно лиофилизированного водного раствора, например белкового состава, который получают путем объединения белка, буфера, неионогенного поверхностно-активного вещества и одного или более стабилизаторов в воде. Затем раствор лиофилизируют для приготовления таблетки с желаемым целевым содержанием остаточной влаги.

Следует понимать, что способ не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых процессов лиофилизации, составов, лиофилизатора, способов измерения давления, фармацевтических продуктов, пептидов, белков или антител. Последовательная маркировка этапов способа цифрами и/или буквами, как предложено в данном документе, не предназначена для ограничения способа или любых вариантов его реализации конкретным указанным порядком.

Различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются по всему описанию изобретения. Каждая из данных цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме и для любых целей посредством ссылки. 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 данное изобретение.

Данное раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие Примеры, которые предложены для более подробного описания данного раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного раскрытия.

### **Примеры**

Способы.

1. Определение остаточной влаги.

Согласно Patel et al. процент остаточной влаги в образцах при лиофилизации определяли с помощью гравиметрического способа или способа Карла Фишера. Флаконы, содержащие лиофилизированные образцы, извлекали с помощью пробоотборника. Если образец в отобранном флаконе полностью обратно плавится после нагревания до комнатной температуры из-за наличия остаточного льда, остаточную влагу рассчитывали гравиметрически. Если образец в отобранном флаконе сохранял структуру таблетки, остаточную влагу определяли с помощью анализатора остаточной влаги по способу Карла Фишера. В некоторых вариантах реализации данного изобретения для извлечения флаконов, содержащих лиофилизированные образцы, цикл лиофилизации был остановлен для извлечения образцов. Затем цикл лиофилизации возобновляли. В некоторых вариантах реализации данного изобретения для анализа процентного содержания остаточной влаги в образцах использовали анализатор остаточной влаги Vapor Pro® (Arizona Instrument LLC). Образец нагревали в анализаторе

влаги Varog Pro, а выделяющиеся летучие вещества перенаправляли в аналитическую ячейку для измерения содержания влаги в потоке газа для преобразования в общую воду для расчета процентного содержания воды.

Пример 1. Определение завершения основной сушки.

Предыдущие исследования были проведены для изучения стабильности лиофилизированных белковых составов. Результаты продемонстрировали, что лиофилизированные продукты, содержащие около 0% влаги, имели относительно более низкую стабильность с образованием большего количества агрегатов с высокой молекулярной массой (ВММ). Лيوфилизированные продукты с содержанием влаги около 3-5% обладали более высокой стабильностью при меньшем количестве агрегатов ВММ. Целевое содержание остаточной влаги в лиофилизированном продукте для достижения оптимальной стабильности в условиях хранения при 25°C оценивается как около 4,0%, около 4,5% или около 3-5%.

Для достижения целевого содержания остаточной влаги в лиофилизированном продукте около 4,0%, около 4,5% или около 3-5% для достижения оптимальной стабильности в условиях хранения при 25°C в процессе лиофилизации определяли завершение основной сушки, например, сублимации. Кажущаяся конечная точка основной сушки, например начала, середины и завершения, определялась с помощью измерений с помощью вакуумметра Пирани в различные моменты времени основной сушки, как представлено на фиг. 4 в соответствии с Patel et al. Согласно Patel et al., профиль остаточной воды в процентах при неполной сублимации льда имеет отношение к давлению в камере, которое измеряется вакуумметром Пирани и/или емкостным манометром. Разницы между измерениями, полученными с помощью вакуумметра Пирани (ВП) и емкостного манометра (ЕМ), например, ВП-ЕМ, использовались в качестве индикаторов для определения точки полного окончания, которая указывала на завершение сублимации (основной сушки) в процессах лиофилизации. Эксперименты проводились с использованием белковых составов, содержащих 5% сахарозы или 5% маннита. Измерения ВП-ЕМ, соответствующие точке начала процесса, продемонстрировали около 25% остаточной влаги в образце, как представлено на фиг. 4. Измерения ВП-ЕМ, соответствующие точке середины процесса, продемонстрировали около 9% остаточной влаги в образце, как представлено на фиг. 4. Измерения ВП-ЕМ, соответствующие точке окончания процесса, продемонстрировали около 5% остаточной влаги, когда сублимация льда полностью завершилась в образце как представлено на фиг. 4. Белковый состав, содержащий 5% сахарозы, имел около 5% остаточной влаги в точке окончания процесса. Белковый состав, содержащий 5% маннита, имел около 4% остаточной влаги в точке окончания процесса.

Пример 2. Разработка процессов лиофилизации для достижения целевого уровня остаточной влаги

Для достижения целевого содержания остаточной влаги около 3-5% в лиофилизированном продукте были исследованы различные экспериментальные параметры процессов лиофилизации. Были исследованы различные температуры полки во время основной сушки, такие как 0, -10, -20 или -30°C. Конечную сушку (или продолжение основной сушки) проводили после завершения сублимации (например, основной сушки). Для исследования изменений скорости десорбции во время конечной сушки были протестированы несколько температур полки при конечной сушке, такие как 0, -10, -20 или -30°C. Температура полки при конечной сушке в планах экспериментов по данному изобретению была существенно ниже, чем при стандартной конечной сушке, поскольку стандартная конечная сушка обычно проводилась при более высоких температурах для достижения содержания остаточной влаги менее около 1% или около 2%, например, около 40°C, около 35-55°C или около 25-55°C. В отличие от этого, для достижения низкой скорости десорбции конечную сушку по данному изобретению проводили при температуре, которая была такой же, как температура полки во время основной сушки, при температуре, которая была немного выше, чем температура полки во время основной сушки, или при температуре, которая была ниже температуры полки во время основной сушки, как представлено на фиг. 3.

Давление в камере лиофилизатора поддерживали при стандартных условиях около 100 мТорр. Были исследованы различные белковые составы, включая белковый состав, содержащий сахарозу при соотношении белка к сахарозе 1:1, например, содержащий 50 мг/мл белка и 50 мг/мл сахарозы. Глубина заполнения стеклянного флакона составляла около 1 см, например, в стеклянный флакон объемом 5 мл помещали 2,5 мл. Этап контролируемой нуклеации использовали во время стадии замораживания в процессе лиофилизации, поскольку способ замораживания продукта может повлиять на его последующее поведение при сушке и характеристики качества конечного продукта. Контролируемая нуклеация может способствовать быстрой скорости кристаллизации, например образованию более крупных кристаллов льда. Крупные кристаллы льда могут оказывать более низкое сопротивление потоку водяного пара от поверхности сублимации льда, чтобы сократить время, необходимое для основной сушки. Кроме того, контроль нуклеации во время замораживания приводит к меньшей изменчивости внутри партии и между партиями. Флаконы извлекали в различные моменты времени для анализа, включая изучение внешнего вида таблетки, содержания влаги и температуры стеклования. Белковые составы, содержащие МАВВ (моноклональное антитело), использовали для лиофилизации, например приготовленного лекарственного вещества, содержащего 50 мг/мл МАВВ, 10 мМ ацетата, 25 мМ гидрохлорида аргинина, 0,2% полисорбата 80 и 5% сахарозы при pH 5,3. Соотношение сахарозы и белка

составляло 1:1.

Конечную сушку проводили при той же температуре полки, что и при основной сушке путем продления основной сушки. Были исследованы температуры полки при 0, -10, -20 и -30°C. Скорости десорбции после завершения сублимации анализировали путем определения процентного содержания остаточной воды в различные моменты времени, как представлено на фиг. 5. Процентное содержание остаточной воды, соответствующее различным моментам времени сушки, имеет экспоненциальную кривую затухания. Остаточное содержание воды уменьшалось со скоростью, пропорциональной ее текущей скорости, первоначально с увеличением времени сушки. В конце концов затухание достигло плато, приближающегося к постоянному значению. Когда температура полки поддерживалась на уровне -30°C, снижение содержания остаточной воды достигло плато, близкого к 3,5%, что соответствовало диапазону целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%, как представлено на фиг. 5. Поскольку конечное значение находилось в пределах целевого процента, время сушки можно увеличить без дальнейшего снижения содержания влаги при температуре полки -30°C.

Как представлено на фиг. 5, когда температура полки поддерживалась на уровне -20°C, снижение содержания остаточной влаги достигло плато, близкого к 2,5%, что выходило за пределы диапазона целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%. Когда температура полки поддерживалась на уровне -10°C, снижение содержания остаточной влаги достигло плато, близкого к 2,1%, что выходило за пределы диапазона целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%. Когда температура полки поддерживалась на уровне 0°C, снижение содержания остаточной влаги достигло плато, близкого к 1,2%, что выходило за пределы диапазона целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%. Следовательно, для более высоких температур полки, таких как -20°C, -10°C или 0°C, необходимо контролировать время сушки, чтобы достичь целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%. Время сушки для достижения целевого содержания влаги в лиофилизированном продукте при заданной температуре полки можно рассчитать по уравнению экспоненциального затухания, зная скорость десорбции при данной температуре полки. Когда температура полки была относительно выше, время сушки после завершения сублимации было относительно короче, чтобы в достаточной степени снизить содержание влаги до целевого процента, контролируя скорость десорбции.

Пример 3. Температура стеклования продукта.

Были проанализированы температуры стеклования (Tg) лиофилизированных белковых составов в соответствии с процентным содержанием остаточной влаги. Белковые составы, содержащие 50 мг/мл МАВВ (моноклонального антитела), 5% сахарозы, 25 мМ гидрохлорида аргинина, 10 мМ ацетата и 0,2% полисорбата 80 при рН 5,3, были лиофилизированы. Как представлено на фиг. 6, Tg значительно снижалась при увеличении процентного содержания остаточной влаги. Рекомендуемая температура хранения была ниже 52°C при остаточной влаге 2,5%, 43°C при остаточной влаге 3,3%, 42°C при остаточной влаге 3,6%, 33°C при остаточной влаге 4,9% и 25°C при остаточной влаге 6,6%. Для продукта, хранящегося при комнатной температуре, содержание влаги в данном составе предпочтительно не превышает 5%.

Пример 4. Внешний вид лиофилизированной таблетки.

Были исследованы различные циклы лиофилизации для изучения внешнего вида лиофилизированных таблеток. Желательно, чтобы таблетка не имела признаков разрушения или обратного плавления во время лиофильной сушки. Обратное плавление таблетки может быть связано с эвтектическим плавлением кристаллических агентов в составе продукта на границе зоны сублимации льда во время основной сушки. Обратное плавление таблетки можно рассматривать как форму частичного или полного разрушения таблетки, вызванного неполной сублимацией льда при основной сушке. Желательная таблетка имеет в основном однородный вид с небольшими отслаиваниями или крошением вдоль поверхностей или краев.

Были исследованы шесть различных циклов лиофилизации с использованием температуры полки во время основной сушки -20°C или -30°C, как представлено в табл. 1. Белковые составы, содержащие МАВВ (моноклональное антитело), использовали для лиофилизации, с применением приготовленного лекарственного вещества, содержащего 50 мг/мл МАВВ, 10 мМ ацетата, 25 мМ гидрохлорида аргинина, 0,2% полисорбата 80 и 5% сахарозы при рН 5,3. Соотношение сахарозы и белка составляло 1:1.

Таблица 1

Условия основной сушки

Цикл №	Контролируемая нуклеация при -5°C	Ts (Температура полки, °C)	Давление в камере = EM (мТорр)	Абсолютная разница (ВП-ЕМ) приблизительно в конце цикла (мТорр)
1	Да	-20	100	40
2	Да	-20	100	5

Цикл №	Контролируемая нуклеация при -5°C	Ts (Температура полки, °C)	Давление в камере = EM (мТорр)	Абсолютная разница (ВП-EM) приблизительно в конце цикла (мТорр)
3	Да	-30	100	5
4	Да	-20	100	1
5	Да	-30	100	0
6	Да	-30	100	15

Давление в камере лиофилизатора поддерживали при стандартных условиях около 100 мТорр. Этап контролируемой нуклеации при -5°C использовали на стадии замораживания процесса лиофилизации. Давление в камере лиофилизатора измеряли с помощью вакуумметра Пирани и емкостного манометра. Разницы между измерениями, полученными с помощью вакуумметра Пирани (ВП) и емкостного манометра (EM), например ВП-EM, использовались в качестве индикаторов для определения общей конечной точки завершения сублимации (основной сушки) в процессах лиофилизации.

Когда достигается желательная разность абсолютных давлений, например, ВП-EM, процессы лиофилизации во время основной сушки завершаются. Результаты исследований представлены в табл. 2. Таблетки в циклах 1 и 6 продемонстрировали форму обратного плавления, что указывало на наличие льда из-за незавершенности сублимации, когда разница (ВП-EM) является большой (15 мТорр или выше). Таблетки в циклах 2-5 продемонстрировали внешний вид подходящих таблеток, например, без разрушения, обесцвечивания и обратного плавления, что указывает на завершение сублимации льда, когда разница (ВП-EM) является маленькой (5 мТорр или ниже). После завершения сублимации процент остаточной влаги продуктов лиофилизации использовали для моделирования кривых скорости десорбции.

Таблица 2

## Исследованием разницы абсолютного давления

Цикл №	Ts (Температура полки, °C)	ВП-EM (мТорр)	Внешний вид лиофилизированной таблетки
1	-20	40	Обратное плавление
2	-20	5	Подходящая таблетка
3	-30	5	Подходящая таблетка
4	-20	1	Подходящая таблетка
5	-30	0	Подходящая таблетка
6	-30	15	Обратное плавление

Пример 5. Процессы лиофилизации с большей продолжительностью.

Циклы лиофилизации с большей продолжительностью и большим количеством флаконов были исследованы при температуре полки -20°C. Белковые составы, содержащие МАВВ (моноклональное антитело), использовали для лиофилизации, с применением приготовленного лекарственного вещества, содержащего 50 мг/мл МАВВ, 10 мМ ацетата, 25 мМ гидрохлорида аргинина, 0,2% полисорбата 80 и 5% сахарозы при рН 5,3. Соотношение сахарозы и белка составляло 1:1. Глубина заполнения стеклянного флакона составляла около 1 см, например в стеклянный флакон объемом 5 мл помещали 2,5 мл. Было исследовано 27 флаконов. Давление в камере лиофилизатора поддерживали при стандартных условиях около 100 мТорр.

Конечная точка основной сушки (сублимации) зависела от нагрузки. Как представлено на фиг. 7, окончание сублимации определяли с помощью кривой давления ВП, демонстрирующей окончание перехода, когда значение (ВП-EM) достигло 2, например завершение основной сушки. Содержание остаточной влаги постепенно уменьшалось после завершения сублимации до достижения целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5%, например, снижалось до 4,3 или 3,8%, как представлено на фиг. 7. Когда процесс лиофилизации продолжался в течение более длительного времени, остаточное содержание влаги существенно не снижалось, но оставалось в пределах допустимого диапазона 3-5%. При увеличении продолжительности лиофилизации до нескольких суток остаточное содержание влаги достигало 2,5%.

Скорость десорбции после завершения сублимации анализировали при температуре полки -20 или -30°C. Как представлено на фиг. 8, содержание влаги (ось Y) достигло 9% после завершения сублимации (основной сушки) при температуре полки -30°C. Дополнительная сушка (десорбция) (или расширенная основная сушка) проводилась путем регулирования скорости десорбции при температуре полки -30°C с

увеличенной продолжительностью, такой как 50, 100, 150 ч или дольше, как изображено на оси X на фиг. 8, например время от точки окончания процесса на кривой давления PG (окончание сублимации льда). Полученное содержание остаточной влаги находилось в пределах целевого процента массы остаточной влаги на уровне 3-5% для температуры полки -30°C в течение продолжительного периода времени от около 30 до 150 ч или дольше. Как представлено на фиг. 8, содержание влаги достигло 7% после завершения сублимации (основной сушки) при температуре полки -20°C. Дополнительная сушка (десорбция) проводилась путем регулирования скорости десорбции при температуре полки -20°C с увеличенной продолжительностью, такой как 50, 100, 150 ч или дольше, как изображено на оси X на фиг. 8, например время от точки окончания процесса на кривой давления PG (окончание сублимации льда). Полученное содержание остаточной влаги находилось в пределах целевого массового процента остаточной влаги на уровне 3-5% для температуры полки -20°C в течение 50 ч продолжительности. Полученное содержание остаточной влаги было немного ниже целевого процентного содержания остаточной влаги в течение продолжительного времени до 150 ч или дольше при температуре полки -20°C, что указывает на то, что время десорбции следует контролировать в течение 50 ч при температуре полки -20°C, предпочтительно между от 10 до 30 ч.

План экспериментов (DOE) по разработке лиофилизации был проведен, как представлено в табл. 3. Концентрации белка исследовали на уровне 5-15%. Концентрации сахарозы исследовали на уровне 0-5%. Концентрации гидрохлорида аргинина исследовали на уровне 0-2%.

Таблица 3

План эксперимента (DOE)

Белок, %	Буфер	Сахароза, %	Аргинин HCL, %	Комментарии
5% (50 мг/мл)	X mM буфера Y	0	0	Только белок и буфер
5% (50 мг/мл)	X mM буфера Y	5	0	
5% (50 мг/мл)	X mM буфера Y	0	2	
5% (50 мг/мл)	X mM буфера Y	5	2	
10% (100 мг/мл)	X mM буфера Y	2,5	1	Средняя точка DOE
15% (150 мг/мл)	X mM буфера Y	0	0	Только белок и буфер
15% (150 мг/мл)	X mM буфера Y	5	0	
15% (150 мг/мл)	X mM буфера Y	0	2	
15% (150 мг/мл)	X mM буфера Y	5	2	

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Способ приготовления лиофилизированной таблетки, включающий:
  - приготовление состава, при этом состав содержит по меньшей мере одну молекулу растворителя и пептид или белок;
  - лиофилизацию состава для получения лиофилизированной таблетки, включающую:
    - помещение состава в камеру лиофилизатора,
    - замораживание состава,
    - проведение первичной сушки состава для удаления по меньшей мере одной молекулы замороженного растворителя путем сублимации, при этом первичную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже около 0°C, и
    - проведение дополнительной сушки состава для удаления по меньшей мере одной молекулы растворителя для получения целевого массового процента по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке, при этом дополнительную сушку проводят при температуре полки лиофилизатора, равной или ниже 0°C.
- Способ по п.1, отличающийся тем, что целевое массовое процентное содержание по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке регулируется температурой полки лиофилизатора во время дополнительной сушки с регулируемой скоростью сушки.
- Способ по п.1, отличающийся тем, что целевое массовое процентное содержание по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке регулируется продолжительностью дополнительной сушки.
- Способ по п.1, отличающийся тем, что температура полки лиофилизатора во время

дополнительной сушки равна или немного превышает температуру полки лиофилизатора во время первичной сушки.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки такая же, как температура полки лиофилизатора во время первичной сушки.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки выше, чем температура полки лиофилизатора во время первичной сушки.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что температура полки лиофилизатора во время дополнительной сушки ниже, чем температура полки лиофилизатора во время первичной сушки.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что целевой массовый процент по меньшей мере одной молекулы растворителя в лиофилизированной таблетке составляет около 3-5%, около 4% или около 4,5%.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок, белковый фармацевтический продукт или лекарственный препарат.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что лиофилизированная таблетка стабильна в условиях хранения при комнатной температуре или обладает улучшенной стабильностью при хранении в холодильнике.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна молекула растворителя представляет собой молекулу воды.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает определение окончания первичной сушки на основании изменения давления в камере лиофилизатора.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что температура лиофилизированной таблетки является ниже температуры разрушения лиофилизированной таблетки при первичной сушке.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что состав дополнительно содержит буфер, эксципиент, стабилизатор, криопротектор, объемообразующий агент, пластификатор или их комбинацию.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что буфер содержит ацетат и/или гидрохлорид гистидина.

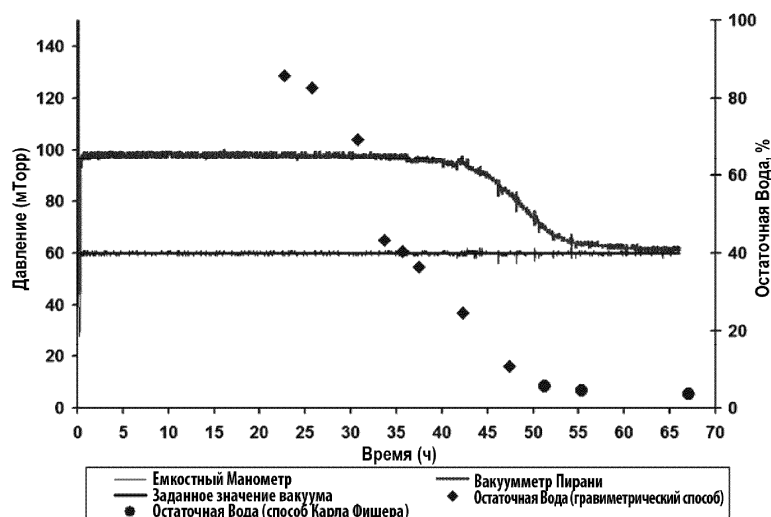
16. Способ по п.14, отличающийся тем, что буфер имеет значение pH около 5,3 или около 6.

17. Способ по п.14, отличающийся тем, что эксципиент представляет собой полисорбат 80.

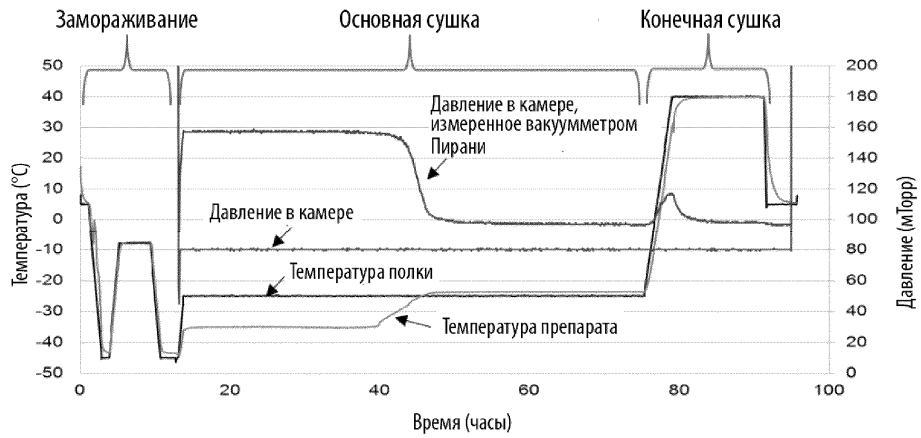
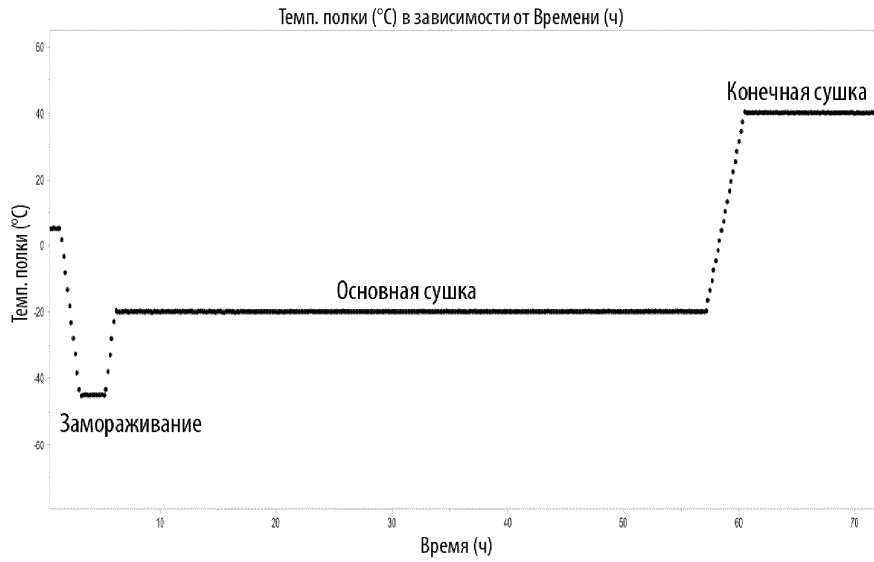
18. Способ по п.14, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой сахарозу, при этом соотношение сахарозы к пептиду или белку составляет около 1:1, около 3:1, около 10:1 или от около 1:1 до около 10:1.

19. Способ по п.14, отличающийся тем, что стабилизатор представляет собой полиол, сахарозу, маннит, трегалозу, сорбит, аминокислоту или их комбинацию.

20. Способ по п.14, отличающийся тем, что криопротектор представляет собой поверхностно-активное вещество, сахар, соль, аминокислоту или их комбинацию.

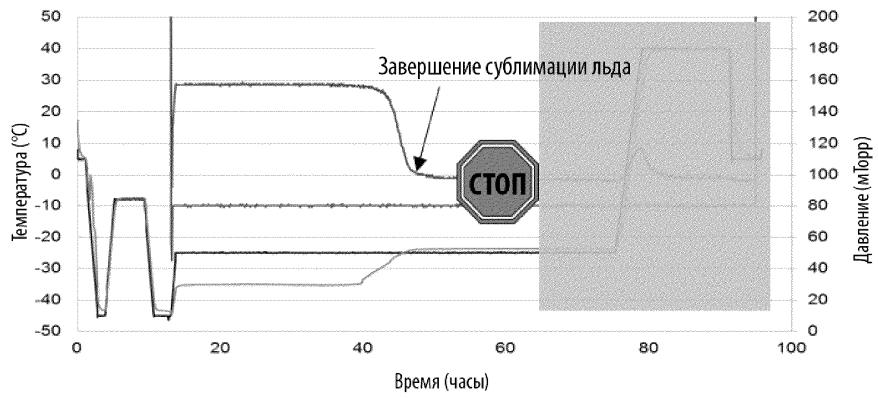
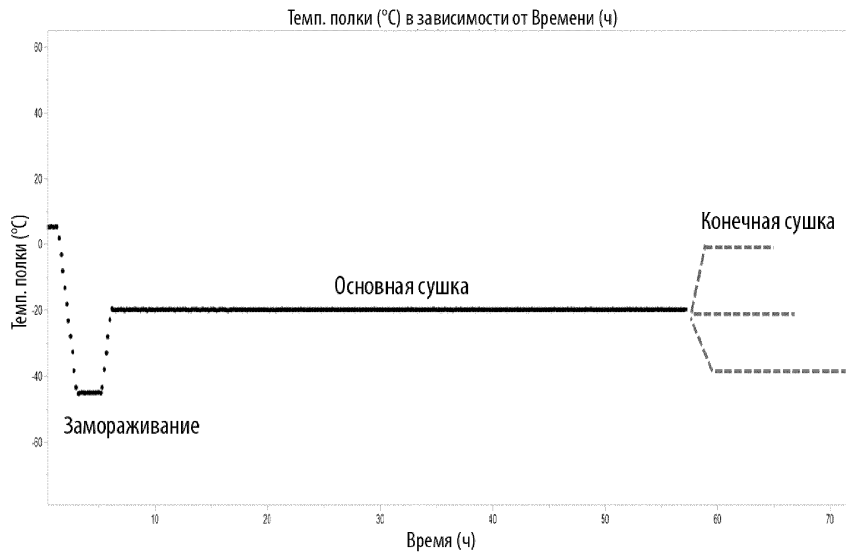


Фиг. 1

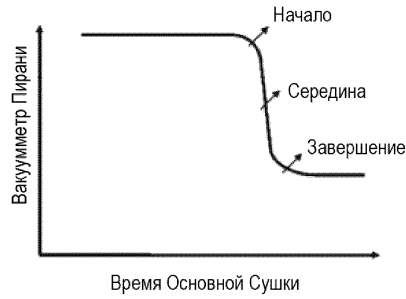
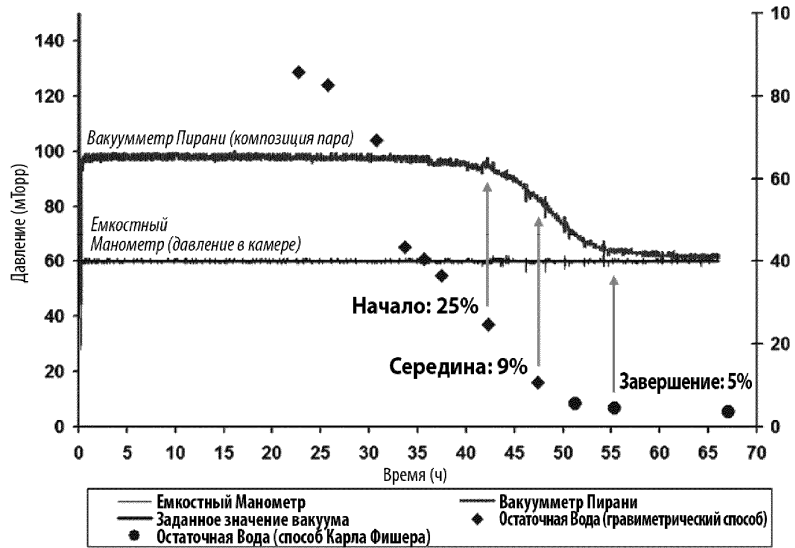


Фиг. 2



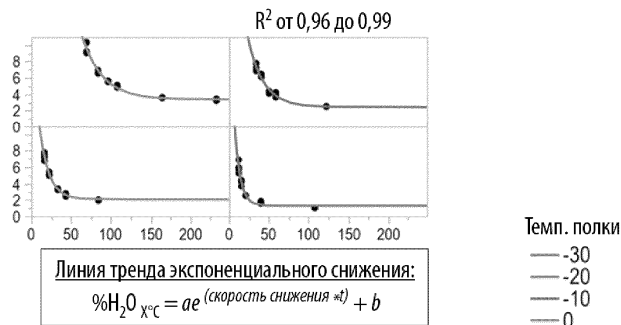
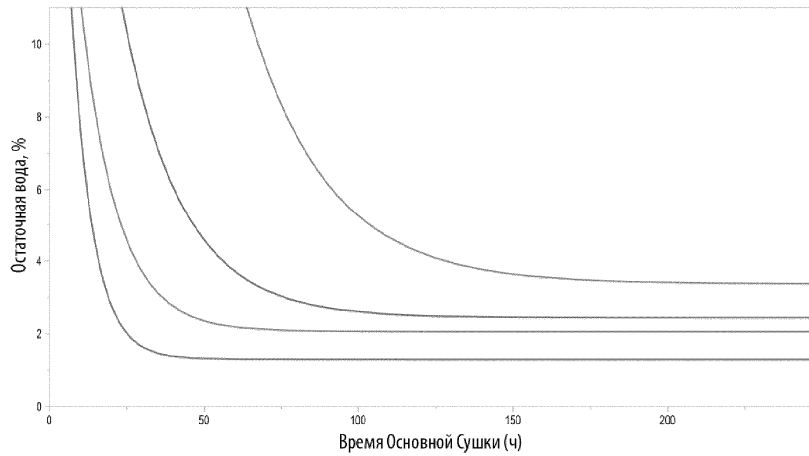


Фиг. 3

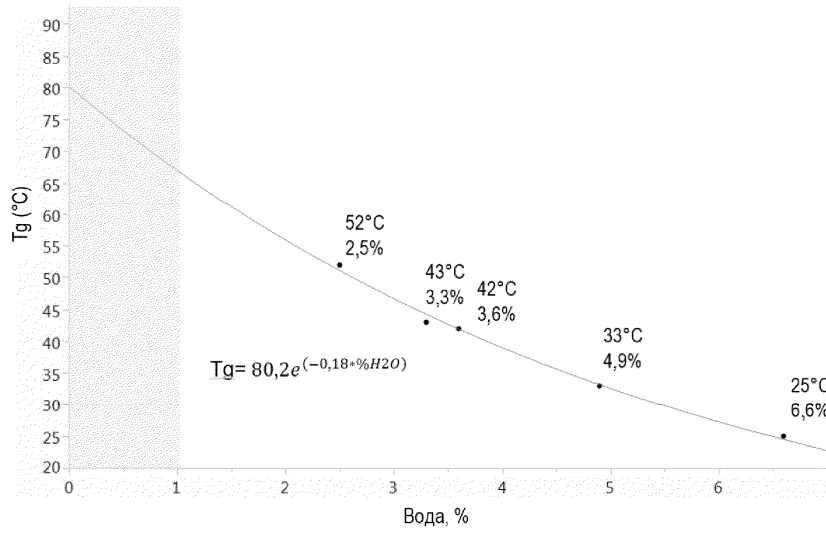


Лиофил. Раствор	% H2O при Завершении
Сахароза 5%	5
Маннит 5%	4

Фиг. 4

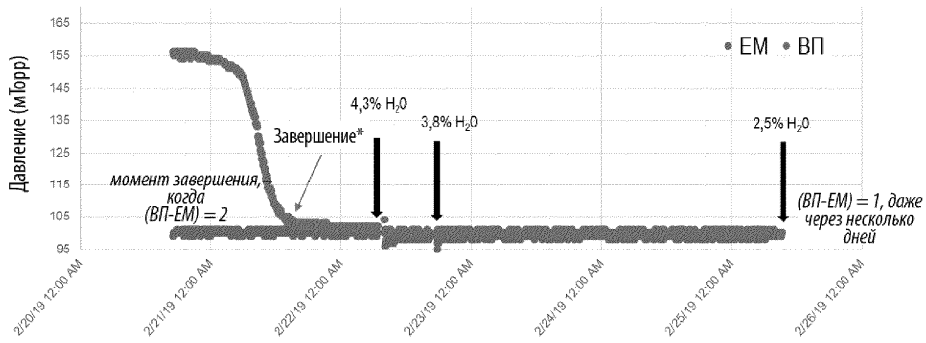


Фиг. 5

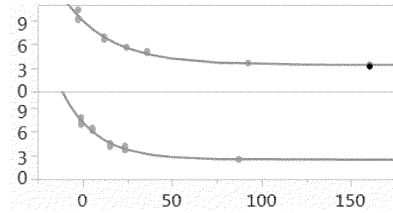
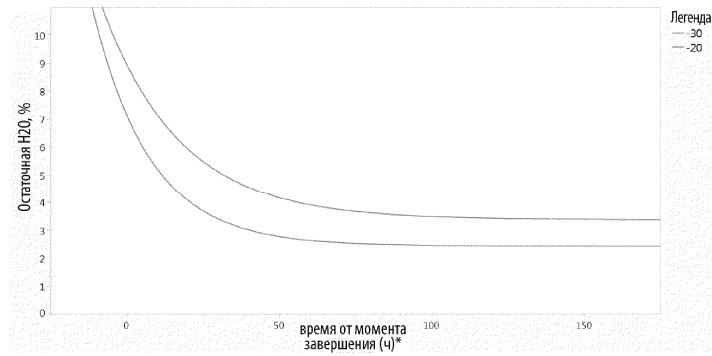


Чистый Эксципиент	Tg (°C)
Сахароза	68-75
МАВВ	Н/Д
Аргинин НСI	Н/Д
ПС 80	Н/Д
Ацетат	следовое количество
Вода	-140

Фиг. 6



Фиг. 7



Линия тренда экспоненциального снижения:

$$\%H_2O_{-30^\circ C} = 5,59e^{(-0,0388 \cdot t)} + 3,36$$

$$\%H_2O_{-20^\circ C} = 4,72e^{(-0,0528 \cdot t)} + 2,42$$

100

150

Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2