

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048044**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.10.22**

(21) Номер заявки  
**202192422**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.03.03**

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 47/26* (2006.01)  
*A61K 47/42* (2017.01)

---

(54) **СПОСОБ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ЧАСТИЦ  
ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СОСТАВЕ**

---

(31) **62/813,843**

(32) **2019.03.05**

(33) **US**

(43) **2021.12.09**

(86) **PCT/US2020/020752**

(87) **WO 2020/180850 2020.09.10**

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

(72) Изобретатель:  
**Ким Дороги, Марлоу Майкл (US)**

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

(56) GARIDEL P. ET AL. "A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: A contribution to understand colloidal protein stabilisation", BIOPHYSICAL CHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 143, no. 1-2, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 70-78, XP026140681, ISSN: 0301-4622, DOI: 10.1016/J.BPC.2009.04.004, [retrieved on 2009-04-16], page 71, column 2, lines 29-32, abstract, the whole document

WO-A1-2017117311

FABIO POLTICELLI ET AL. "GA/GB Fold switching may modulate fatty acid transfer from human serum albumin to bacteria", IUBMB LIFE, vol. 64, no. 11, 22 October 2012 (2012-10-22), pages 885-888, XP055702939, ISSN: 1521-6543, DOI: 10.1002/iub.1083, abstract

---

(57) Предложен способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе, образованных в составе, способном образовывать частицы жирных кислот, и способ сольбилизации частиц жирных кислот, включающие получение состава, включающего активный фармацевтический агент, полисорбат и по меньшей мере одну липазу, где указанный состав способен образовывать частицы жирных кислот и добавление в состав эффективного количества человеческого сывороточного альбумина.

**B1**

**048044**

**048044**

**B1**

### **Область техники**

Изобретение в целом относится к способам уменьшения или предотвращения образования частиц жирных кислот в лекарственных составах.

### **Уровень техники**

В области разработки лекарственных составов ставится множество задач, связанных с улучшением их характеристик при производстве, хранении, обращении и введении, а также сведением к минимуму нежелательных побочных эффектов. Например, разработка состава направлена на определение условий раствора и добавок или эксципиентов, которые увеличивают стабильность и уменьшают возникновение химических или физических изменений, которые часто приводят к агрегации и могут впоследствии привести к увеличению количества невидимых или видимых частиц.

Предотвращение и уменьшение образования частиц в составе инъекционных лекарственных продуктов является особенно сложной задачей и предметом дискуссий и исследований в фармацевтической промышленности в течение нескольких лет. Состоящие из синтетических или биологических материалов и происходящие из различных источников частицы, которые являются видимыми или даже невидимыми, могут повысить потенциальную иммуногенность у пациентов и могут по-разному влиять на качество лекарственного продукта. Одной из таких возможных примесей могут быть частицы жирных кислот, которые образуются во время производства, транспортировки, хранения, обращения или введения. Частицы жирных кислот могут потенциально вызывать неблагоприятные иммуногенные эффекты и влиять на срок хранения.

Следует понимать, что существует потребность в улучшенных способах уменьшения или предотвращения образования частиц жирных кислот в белковых составах и в белковых составах, которые имеют пониженный уровень частиц жирных кислот.

### **Сущность изобретения**

Поддержание стабильности лекарственных составов не только во время хранения, но и во время производства, транспортировки, обращения и введения является основной задачей. Среди лекарственных продуктов белковые биотерапевтические препараты приобретают все большую популярность благодаря их успеху и универсальности. Терапевтические белки - это самый быстрорастущий класс лекарств, на который приходится около трети рынка лекарств. Одна из основных задач при разработке белковых биотерапевтических препаратов состоит в том, чтобы преодолеть ограниченную стабильность белков, на которую может влиять присутствие видимых и невидимых частиц. Это связано с растущими опасениями по поводу потенциальной иммуногенности частиц - как белковых, так и небелковых частиц. Уменьшение образования таких частиц может быть важным этапом при разработке лекарственного состава. В частности, одной из задач является предотвращение или уменьшение образования частиц жирных кислот в составах.

В настоящем изобретении предложен способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составах.

В одном примерном варианте осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в эффективном количестве в состав, способный образовывать частицы жирных кислот.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав, способный образовывать частицы жирных кислот, может содержать полисорбат.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав, способный образовывать частицы жирных кислот, содержит полисорбат, выбранный из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80 и их комбинаций.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав, способный образовывать частицы жирных кислот, содержит от около 0,001% мас./об. до около 1% мас./об. полисорбата.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав, способный образовывать частицы жирных кислот, содержит полисорбат и по меньшей мере один белок.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав, способный образовыв-



вызывать частицы жирных кислот, при этом частицы жирных кислот могут содержать свободные жирные кислоты.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом частицы жирных кислот могут содержать свободные жирные кислоты и соотношение молекул свободных жирных кислот к молекулам человеческого сывороточного альбумина может составлять от около 6:1 до около 1:1.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом частицы жирных кислот могут содержать свободные жирные кислоты, выбранные из группы, состоящей из олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, миристиновой кислоты, лауриновой кислоты и их комбинаций.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление по меньшей мере около 5,5 мг/мл человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом состав может быть парентеральным составом.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом частицы жирных кислот являются видимыми или невидимыми частицами.

В одном аспекте этого варианта осуществления способ солубилизации частиц жирных кислот в составе может включать добавление человеческого сывороточного альбумина в состав, способный образовывать частицы жирных кислот, при этом частицы жирных кислот можно обнаружить с помощью рамановской спектроскопии.

Эти и другие аспекты изобретения будут более очевидны и понятны при рассмотрении в сочетании с описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает различные варианты осуществления и их многочисленные конкретные детали, приведено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перестановки могут быть выполнены в пределах объема настоящего изобретения.

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

На фиг. 1 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для концентрации липазы для оценки способности липазы из *Chromobacterium viscosum* генерировать частицы жирных кислот путем стимуляции разложения PS80, в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 2 показан график зависимости рамановской интенсивности (а. е.) от рамановского сдвига (1/см) для идентификации состава частиц, относящихся к жирным кислотам, которые были получены в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 3 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для различных концентраций FAF-HSA, добавленных к раствору, содержащему полисорбат, полученному в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 4 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для различных концентраций SA-HSA, добавленных к раствору, содержащему полисорбат, полученному в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 5 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для различных концентраций поликлонального IgG без добавления HSA.

На фиг. 6 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для составов, содержащих моноклональное антитело, которое не лиофилизировано (панель А) и лиофилизировано (панель В).

На фиг. 7 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени при добавлении 4,5 мг/мл FAF-HSA (панель А) и 7,5 мг/мл FAF-HSA (панель В) к различным концентрациям поликлонального IgG в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 8 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для различных концентраций сыворотки, добавленной к предварительно сформированным частицам жирных кислот в соответствии с примерным вариантом осуществления.

На фиг. 9 показан график зависимости поглощения при 450 нм от времени для составов, содержащих человеческую сыворотку и предварительно сформированные частицы свободных жирных кислот в растворе.

#### **Подробное описание**

Среди лекарственных препаратов биотерапевтические препараты на основе белков являются важным классом лекарств, которые предлагают высокий уровень селективности, активности и эффективности, о чем свидетельствует значительное увеличение количества клинических испытаний моноклональных антител (mAb) за последние несколько лет. Введение белкового биотерапевтического препарата в

клиническое применение может быть многолетним мероприятием, требующим скоординированных усилий в различных областях исследований и разработок, включая открытие, разработку процесса и состава, аналитическое исследование, а также доклиническую токсикологию и фармакологию. Одним из критических аспектов клинически и коммерчески конкурентоспособного биотерапевтического препарата является стабильность лекарственного продукта с точки зрения производственного процесса, а также срока хранения. Подобно многим очищенным белкам, нативная конформационная стабильность mAb относительно небольшая, обычно порядка 20-25 ккал/моль (Kristi L. Lazar, Thomas W. Patapoff & Vikas K. Sharma, Cold denaturation of monoclonal antibodies, 2 MABS 42-52 (2010)). Это часто требует соответствующих этапов, чтобы помочь увеличить физическую и химическую стабильность mAb в условиях разных растворов и сред, необходимых для производства и хранения, с минимальным влиянием на качество продукта, включая идентификацию молекул с большей естественной стабильностью, инженерию белков и разработку рецептур. Разработка состава направлена на определение условий раствора и добавок или эксципиентов, которые увеличивают стабильность mAb и уменьшают возникновение химических или физических изменений, которые часто приводят к агрегации и могут впоследствии привести к увеличению количества невидимых или видимых частиц.

Видимые и невидимые частицы, особенно в готовых лекарственных продуктах, в течение нескольких лет были предметом дискуссий и исследований в фармацевтической промышленности и могут вызывать вопросы по поводу качества. Состоящие из синтетических или биологических материалов и происходящие из различных источников частицы увеличивают возможность потенциальных иммуногенных эффектов у пациентов (S. Bukofzer et al., Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particles in Injectable Drug Products, 69 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 123-139 (2015); S. E. Langille, Particulate Matter in Injectable Drug Products, 67 PDA JOURNAL OF Pharmaceutical Science and Technology 186-200 (2013)) и могут по-разному влиять на лекарственный продукт. Может быть несколько причин образования видимых и невидимых частиц в составе, который может включать белковые и небелковые частицы. Такие частицы могут приводить к растущим опасениям по поводу потенциальной иммуногенности. Несмотря на то, что Фармакопея США (USP) и Европейская фармакопея (Ph. Eur.) в настоящее время определяют пределы концентрации в парентеральных растворах только для частиц размером более 10 мкм, регулирующие органы все чаще ожидают количественного исследования микронных частиц размером от 1 до 10 мкм и качественного исследования субмикронных частиц от 100 нм до 1000 нм уже на ранних стадиях разработки (USP <788>. В: The United States Pharmacopoeia, National Formulary. 2009; Ph.Eur. 2.9.19).

Видимые и невидимые частицы в лекарственных формах могут быть связаны с содержанием свободных жирных кислот и последующим образованием частиц жирных кислот. Образование свободных жирных кислот и связанных с ними частиц жирных кислот может происходить в белковых составах, содержащих полисорбаты. Более семидесяти процентов продаваемых на рынке терапевтических средств на основе моноклональных антител содержат от 0,001% до 0,1% полисорбата для защиты белка от межфазных стрессов, таких как адсорбция и агрегация. Многие препараты полисорбатов содержат смесь жирных кислот с различной длиной цепей; например, полисорбат 80 содержит олеиновую, пальмитиновую, миристиновую и стеариновую жирные кислоты, причем моноолеатная фракция составляет около 58% полидисперсной смеси (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016)). Полисорбаты подвержены автоокислению, зависящему от pH и температуры, и, кроме того, воздействие УФ-света также может вызывать нестабильность (Ravuri S.K. Kishore et al., Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis, 100 Journal of Pharmaceutical Sciences 721-731 (2011)), в результате чего в растворе образуются свободные жирные кислоты вместе с головной группой сорбитана. Таким образом, полисорбаты могут способствовать образованию частиц за счет автоокисления и гидролиза, что приводит к образованию свободных жирных кислот и последующему образованию частиц жирных кислот. Гидролиз полисорбата различными белками клетки-хозяина, такими как подобный фосфолипазе В белок 2 (PLBL2) и липопротеинлипаза (Josephine Chiu et al., Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations, 114 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1006-1015 (2016)), может привести к образованию свободных жирных кислот при определенных условиях (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in the Sulfatase Drug Product, Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE, 1657-1666 (2016)). Эти свободные жирные кислоты и, аналогично, длинноцепочечные жирные кислоты (стеарат, олеат, пальмитат и другие), которые образуются в результате разложения осадка PS20 из-за низкой растворимости (Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792-3804 (2015); Steven R. Labrenz, Ester Hydrolysis of Polysorbate 80 in mAb Drug Product: Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations, 103 Journal of Pharmaceutical Sciences 2268-2277 (2014)), которая в текущей модели потенциально может привести к образованию частиц жирных кислот в лекарстве.

В нескольких отчетах подробно описывается присутствие видимых и невидимых частиц в лекарственных препаратах, содержащих полисорбат 20 или полисорбат 80 (Xiaolin Cao et al., Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 1: Microspectroscopic Identification, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE 433-446 (2015); Christine C Siska et al., Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 2: Contribution of Polysorbate Raw Material, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 447-456 (2015); Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICAL 3792-3804 (2015); Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016); Anthony Tomlinson et al., Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 Molecular Pharmaceutics 3805-3815 (2015); Troii Hall et al., Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A 2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE 1633-1642 (2016)). Частицы, исследованные спектроскопическими методами и состоящие из жирных кислот (Nidhi Doshi, Barthélemy Demeule & Sandeep Yadav, Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations, 12 MOLECULAR PHARMACEUTICS 3792-3804 (2015); Anthony Tomlinson et al., Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 Molecular Pharmaceutics 3805-3815 (2015), чистого белка (Xiaolin Cao et al., Free Fatty Acid Particles in Protein Formulations, Part 1: Microspectroscopic Identification, 104 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE 433-446 (2015)), или смеси жирных кислот и белка, позволяют предположить, что гидролиз полисорбата может непосредственно способствовать появлению частиц в готовых лекарственных продуктах. Белки клетки-хозяина, в частности липазы, упоминаются в качестве вероятной первопричины (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016)). Таким образом, хотя в соответствии с действующим стандартом Фармакопеи США (USP) остаточный белок клетки-хозяина составляет <100 м. д. (Catalin Doneanu et al., Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MABS 24-44 (2012)), присутствие незначительных уровней липаз клетки-хозяина может привести к гидролизу полисорбата, что приведет к высвобождению свободных длинноцепочечных жирных кислот. Кроме того, критерии содержания частиц, изложенные в Фармакопее США, устанавливают ограничения на уровне 6000 частиц/контейнер при размере более 10 мкм и 600 частиц/контейнер при размере более 25 мкм (USP General Chapter 788, Particulate Matter in Injections), предполагая, что присутствие липаз клетки-хозяина может потенциально повлиять на срок хранения (S. Bukofzer et al., Industry Perspective on the Medical Risk of Visible Particle in Injectable Drug Products, 69 PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY 123-139 (2015)).

Общая однородность препаратов полисорбатов, а также естественная долгосрочная стабильность полисорбатов могут вызвать проблемы, связанные с содержанием свободных жирных кислот. Хотя безопасность и эффективность лекарственных продуктов, содержащих частицы жирных кислот, не были полностью оценены, очевидно, что полезно избегать потенциальных проблем с качеством. Хотя остается неясным, вызывают ли частицы жирных кислот иммуногенный ответ у пациентов, частицы в лекарственных продуктах в целом считаются нежелательными.

В отсутствие известных способов уменьшения образования частиц жирных кислот или быстрой и полной солюбилизации предварительно сформированных частиц были разработаны эффективные способы и составы, как описано в данном документе. Также раскрыты экспериментальная система для быстрого получения частиц жирных кислот и новое применение человеческого сывороточного альбумина в контексте биотерапевтических составов.

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 принадлежит это изобретение. Хотя любые методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в этой заявке, можно использовать на практике или при тестировании, далее описаны предпочтительные методы и материалы. Все упомянутые в данном документе публикации включены посредством ссылки.

Форма единственного числа означает "по меньшей мере, один"; термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, которые будут понятны специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, включены конечные точки.

Поскольку присутствие частиц жирных кислот в биотерапевтических препаратах может вызывать серьезную озабоченность во всех отраслевых компаниях, от компаний до регулирующих органов, поставщиков и пациентов, способы предотвращения и/или уменьшения образования таких частиц жирных кислот и составы, которые могут иметь пониженный уровень таких частиц жирных кислот и/или предотвращать образование таких частиц жирных кислот, важны при разработке фармацевтических лекарственных препаратов.

В некоторых примерных вариантах осуществления в изобретении предложен состав с пониженным уровнем частиц жирных кислот и/или способный предотвращать образование таких частиц жирных кислот, содержащий активный фармацевтический агент.

Используемый в данном документе термин "состав" относится к активному фармацевтическому агенту, который составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Используемый в данном документе термин "активный фармацевтический агент" может включать биологически активный компонент лекарственного продукта. Активный фармацевтический агент может относиться к любому веществу или комбинации веществ, используемых в лекарственном продукте, предназначенных для обеспечения фармакологической активности или иным образом оказывающих прямое действие при диагностике, лечении, смягчении, лечении или профилактике заболевания или оказывающих прямое действие при восстановлении, коррекции или модификации физиологических функций животных. Неограничивающие способы получения активного фармацевтического агента могут включать использование процесса ферментации, рекомбинантной ДНК, выделения и извлечения из природных ресурсов, химического синтеза или их комбинаций.

В некоторых примерных вариантах осуществления активный фармацевтический агент может быть белком.

Используемый в данном документе термин "белок" может включать любой аминокислотный полимер, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, обычно известных в данной области техники как "полипептиды". "Полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, их родственных встречающихся в природе структурных вариантов и синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных пептидными связями, их родственных встречающихся в природе структурных вариантов и синтетических не встречающихся в природе аналогов. "Синтетические пептиды или полипептиды" относятся к не встречающемуся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или более полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других Fc-слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может содержать фрагменты антител, нанотела, рекомбинантные антитела-химеры, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор по биотерапевтическим белкам и их производстве, см. в Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY and Genetic Engineering Reviews 147-176 (2012)). В некоторых 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, тег FLAG, белок, связывающий мальтозу (MBP), белок, связывающий хитин (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), эпитоп с-мус, флуоресцентные метки и другие красители и тому подобное. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых примерных вариантах осуществления белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или их комбинации.

Термин "антитело" при использовании в данном документе относится к молекулам иммуноглобулина, содержащим четыре полипептидных цепи, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, которые связаны дисульфидными связями, а также к их мультимерам (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно называемую в данном описании HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно называемой в данном описании как LCVR или V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C<sub>L1</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями

ми (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления изобретения FR-области антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям человеческой зародышевой линии, или могут быть природно или искусственно модифицированы. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе анализа с выравниванием двух или более CDR.

Термин "антитело" при использовании в данном документе также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антител. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т. п. при использовании в данном документе включают любой природный, получаемый при обработке ферментами, синтетический или получаемый генно-инженерными методами полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полноразмерных молекул антител, при использовании любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей вариabельные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или может быть легко получена, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (в том числе, например, фаговых библиотек антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и подвергать манипуляциям с использованием химических методов или методов молекулярной биологии, например, размещать один или более вариabельных и/или константных доменов в нужной конфигурации или вводить кодоны, создавать цистеиновые остатки, модифицировать, добавлять или удалять аминокислоты и т. д.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариabельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагменты, Fab, фрагменты, Fab', фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>, фрагменты, scFv, фрагменты, Fv, диатело dsFv, dAb, фрагменты, Fd', фрагменты, Fd и выделенную определяющую комплементарность область (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию вариabельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариabельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых примерных вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность родительского антитела, фрагментом которого он является, чтобы связываться с тем же антигеном, что и родительское антитело; в некоторых примерных вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сравнимой с аффинностью родительского антитела, и/или конкурирует с родительским антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантно из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может содержать, но необязательно, одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может содержать, но необязательно, мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

Выражение "биспецифическое антитело" включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две неидентичные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфично связывает отличный эпитоп - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно выборочно связываться с двумя разными эпитопами (первым эпитопом и вторым эпитопом), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один-два или три, или четыре, или более порядков ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Специфично связываемые биспецифическим антителом эпитопы могут находиться на одной или на разных мишенях (например, на одном белке или разных белках). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариabельные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного иммуногена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими те же или другие константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен  $C_H1$ , шарнирная область, домен  $C_H2$  и домен  $C_H3$ , и легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающую специфичность, но может связы-



ваться с каждой тяжелой цепью, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью и может связывать один или более эпитопов, связываемых эпитопсвязывающими областями тяжелой цепи, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью и делает возможным связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые содержат Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, причем последние обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь разные форматы, такие как, без ограничения, triomab, IgG типа выступы-во-впадины (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двойными варируемыми доменами (DVD-Ig), Fab два-в-одном или двойного действия (DAF), IgG на основе одноцепочечного Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Разные не-IgG-подобные форматы включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAb), молекулы с двойной специфичностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, полученные методом "стыковки и сцепления" (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014)).

Способы получения BsAb не ограничены квадратной технологией, основанной на соматическом слиянии двух разных линий гибридомных клеток, химической конъюгацией, которая включает химические перекрестные линкеры, и генетических подходах с использованием технологии рекомбинантной ДНК. Примеры bsAb включают те, которые раскрыты в следующих патентных заявках, которые включены в данный документ посредством ссылки: U.S. Ser. № 12/823838, подана 25 июня 2010 г.; США № 13/488628, подана 5 июня 2012 г.; США № 14/031075, подана 19 сентября 2013 г.; США № 14/808171, подана 24 июля 2015 г.; США № 15/713574, подана 22 сентября 2017 г.; США № 15/713569, подана 22 сентября 2017 г.; США № 15/386453, подана 21 декабря 2016 г.; США № 15/386443, подана 21 декабря 2016 г.; США № 15/22343 подана 29 июля 2016 г.; США № 15814095, подана 15 ноября 2017 г. Низкие уровни примесей гомодимера могут присутствовать на нескольких этапах производства биспецифических антител. Обнаружение таких примесей гомодимера может быть затруднительным при выполнении с использованием анализа интактной массы из-за низкого содержания примесей гомодимера и совместного элюирования этих примесей с основными видами при проведении с использованием обычного метода жидкостной хроматографии.

Используемый в данном документе термин "мультиспецифическое антитело" или "Mab" относится к антителу имеющим специфичности связывания в отношении по меньшей мере двух разных антигенов. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т. е. биспецифические антитела, BsAb), антитела с дополнительной специфичностью, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть рассмотрены в контексте системы и способа, описанных в данном документе.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми способами, доступными или известными в данной области техники. Моноклональные антитела, применимые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены с помощью методик, хорошо известных в данной области техники, включая использование гибридомных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может содержать активный фармацевтический агент, при этом активный фармацевтический агент может быть небольшой молекулой. Используемый в данном документе термин "малая молекула" может относиться к низкомолекулярным химическим соединениям с молекулярной массой менее 1500 кДа.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может представлять собой белковый состав.

Используемый в данном документе термин "белковый состав" относится к терапевтическому белку, который может быть составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок может присутствовать в количестве единичной дозы, подходящем для введения в терапевтической схеме.

В некоторых других вариантах осуществления состав может дополнительно содержать эксципиенты, включая, без ограничения, буферные агенты, объемообразующие агенты, модификаторы тоничности, поверхностно-активные вещества, солибилизирующие агенты и консерванты. Другие дополнительные эксципиенты, которые также могут быть выбраны на основе функции и совместимости с составами, можно найти, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, (Easton, Pa.: Mack Publishing Co 1975); Liberman, H. A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms (New York, N.Y.: Marcel Decker 1980); и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed (Lippincott Williams & Wilkins 1999), в полном объеме включенных в данный документ посредством ссылки.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может быть стабильным.

Стабильность состава может включать оценку химической стабильности, физической стабильности или функциональной стабильности активного фармацевтического агента. Составы настоящего изобре-

ния обычно демонстрируют значительные уровни стабильности активного фармацевтического агента.

В отношении белковых составов термин "стабильный", используемый в данном документе, относится к тому, что белки в составе композиций могут сохранять приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения в типичных условиях, определенных в данном документе. Состав может быть стабильным, даже если содержащийся в нем 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 может рассматриваться как "стабильное".

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно использовать для лечения, профилактики и/или облегчения заболевания или расстройства. Типичные, неограничивающие заболевания и расстройства, которые можно лечить и/или предотвращать введением фармацевтических составов по настоящему изобретению, включают инфекции; респираторные заболевания; боль, возникающую в результате любого состояния, связанного с нейрогенной, невропатической или ноцицептической болью; генетическое расстройство; врожденное нарушение; рак; герпетическое заболевание; хроническую идиопатическую крапивницу; склеродермию, гипертрофическое рубцевание; болезнь Уиппла; доброкачественную гиперплазию предстательной железы; легочные нарушения, такие как легкая, умеренная или тяжелая астма, аллергические реакции; болезнь Кавасаки, серповидно-клеточную анемию; синдром Черджа - Стросс; болезнь Грейвса; преэклампсию; синдром Шегрена; аутоиммунный лимфопролиферативный синдром; аутоиммунную гемолитическую анемию; пищевод 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; ЛПНП-аферез; нарушения, вызванные мутациями, активирующими PCSK9 (мутации с усилением функции, "GOF"), нарушения, вызванные гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (heFH); первичную гиперхолестеринемия; дислипидемию; холестатические заболевания печени; нефротический синдром; гипотиреоз; ожирение; атеросклероз; сердечно-сосудистые заболевания; нейродегенеративные заболевания; мультисистемное воспалительное заболевание с неонатальным началом (NOM ID/CINCA); синдром Макла - Уэльса (MWS); семейный аутовоспалительный холододовый синдром (FCAS); семейную средиземноморскую лихорадку (FMF); синдром периодической лихорадки, связанный с рецептором фактора некроза опухоли (TRAPS); ювенильный идиопатический артрит с системным началом (болезнь Стилла); сахарный диабет 1 и 2 типа; аутоиммунные заболевания; заболевание двигательных нейронов; глазные заболевания; венерические заболевания; туберкулез; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется антагонистом VEGF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется ингибитором PD-1; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к интерлейкину; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к NGF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела против PCSK9; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к ANGPTL; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется антителом к активину; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к GDF; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к Fel d 1; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела к CD; заболевание или состояние, которое облегчается, подавляется или ослабляется с помощью антитела C5, или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту. Введение может осуществляться любым способом. Неограничивающие пути введения включают пероральный, местный или парентеральный. Введение определенными парентеральными путями может включать введение составов согласно настоящему изобретению в организм пациента через иглу или катетер с помощью стерильного шприца или какого-либо другого механического устройства, такого как система для непрерывной инфузии. Состав, предлагаемый в настоящем изобретении, можно вводить с помощью шприца, инжектора, насоса или любого другого устройства, известного в данной области техники для парентерального введения. Состав согласно настоящему изобретению также можно вводить в виде аэрозоля для абсорбции в легких или носовой полости. Составы также можно вводить для всасывания через слизистые оболочки, например, при буккальном введении.

В некоторых примерных вариантах осуществления сывороточный альбумин человека может предотвращать образование частиц жирных кислот. В некоторых примерных вариантах осуществления сывороточный альбумин человека может сольбуилизовать предварительно сформированные частицы жирных кислот. В контексте настоящего описания "человеческий сывороточный альбумин" или "HSA" может включать мономерный белок, синтезируемый в печени. Он может быть основным макромолекулярным компонентом сыворотки с концентрацией до 50 г/л и находится в постоянном потоке между внутрисосудистым и внесосудистым пространством (Angelica M. Merlot, Danuta S. Kalinowski & Des R. Richardson, Unraveling the mysteries of serum albumin - more than just a serum protein, 5 FRONTIERS IN

PHYSIOLOGY (2014)). Среди различных видов биологической активности, HSA может транспортировать молекулы с низкой растворимостью, включая жирные кислоты, по всему организму (Maja Thim Larsen et al., Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease, 4 MOLECULAR AND Cellular Therapies (2016)). HSA может содержать девять различных сайтов связывания жирных кислот, три сайта с высокой аффинностью, один со средней аффинностью и пять сайтов с низкой аффинностью (Eileen S. Krenzel, Zhongjing Chen & James A. Hamilton, Correction to Correspondence of Fatty Acid and Drug Binding Sites on Human Serum Albumin: A Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Study, 52 BIOCHEMISTRY 2382-2382 (2013)).

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может дополнительно содержать полисорбат.

Используемый в данном документе термин "полисорбат" относится к обычному эксципиенту, используемому при разработке препаратов для защиты антител от различных физических нагрузок, таких как при перемешивании, процессах замораживания-оттаивания и на границах раздела воздух/вода (Emily Ha, Wei Wang & Y. John Wang, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, 91 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2252-2264 (2002); Bruce A. Kerwin, Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways, 97 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2924-2935 (2008); Hanns-Christian Mahler et al., Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters, 99 Journal of Pharmaceutical Sciences 2620-2627 (2010)). Полисорбат может включать неионогенное амфипатическое поверхностно-активное вещество, состоящее из сложных эфиров жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана, таких как полиоксиэтиленсорбитановая головная группа и либо боковая цепь насыщенного монолаурата (полисорбат 20; PS20), либо боковая цепь ненасыщенного моноолеата (полисорбат 80; PS80). В некоторых примерных вариантах осуществления полисорбат может присутствовать в составе в диапазоне от 0,001% до 1% (мас./об.). Полисорбат может также содержать смесь жирных кислот с различной длиной цепей; например, полисорбат 80 содержит олеиновую, пальмитиновую, миристиновую и стеариновую жирные кислоты, причем моноолеатная фракция составляет около 58% полидисперсной смеси (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016)). Примеры полисорбатов включают, но не ограничиваются этим, полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60, полисорбат-65 и полисорбат-80.

Полисорбат может быть подвержен автоокислению, зависящему от pH и температуры, и, кроме того, воздействие ультрафиолетового света также может вызывать нестабильность (Ravuri S.K. Kishore et al., Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis, 100 Journal of Pharmaceutical Sciences 721-731 (2011)), в результате чего в растворе образуются свободные жирные кислоты вместе с головной группой сорбитана. Свободные жирные кислоты, полученные из полисорбата, могут содержать любые алифатические жирные кислоты с шестью-двадцатью атомами углерода. Примеры таких свободных жирных кислот включают, но не ограничиваются этим, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, миристиновую кислоту, лауриновую кислоту или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут иметь размер по меньшей мере 5 мкм. Кроме того, эти частицы жирных кислот можно классифицировать по размеру как видимые (> 100 мкм), невидимые (< 100 мкм), которые можно подразделить на микронные (1-100 мкм) и субмикронные (100 нм - 1000 нм) и нанометровые частицы (< 100 нм) (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493-498).

В некоторых примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут быть видимыми частицами. Видимые частицы можно определить визуальным осмотром.

В некоторых примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут быть невидимыми частицами. Невидимые частицы можно контролировать с помощью метода светоблокировки в соответствии с Фармакопеей США (USP).

В некоторых примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут быть образованы из полисорбатов. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут быть образованы из полисорбатов в присутствии фермента липазы. Используемый в данном документе термин "липаса" относится к ферменту, который может катализировать гидролиз жиров. Липазы можно найти практически во всех формах жизни, от животных до растений и микробов.

Суперсемейство липаз млекопитающих может состоять из 7 разных классов, дифференцированных по локализации и субстратной специфичности. Анализ CHO-K1 мРНК обнаружил 137 липаз и фосфолипаз, включая варианты (Benjamin G. Kremkow et al., CHOgenome. org 2.0: Genome resources and website updates, 10 BIOTECHNOLOGY JOURNAL 931-938 (2015)). Липаза, специфически ответственная за разложение полисорбата в очищенных биотерапевтических лекарственных продуктах, не была идентифицирована, и вероятно, что некоторые из них будут обнаружены, что предполагает влияние процесса производства и самого биотерапевтического препарата. Можно провести скрининг нескольких разных липаз от

млекопитающих, грибов и бактерий, доступных из коммерческих источников.

В некоторых примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот можно обнаружить с помощью рамановской спектроскопии. Используемый в данном документе термин "рамановская спектроскопия" относится к спектроскопическому методу, основанному на методе рамановского рассеяния света. Рамановская спектроскопия позволяет получить рамановский спектр, который может идентифицировать присутствие и положение полос в области скелетных колебаний (от 2000 до 400 см<sup>-1</sup>), что позволяет проводить химическую идентификацию анализируемого материала путем сравнения с базой данных рамановских спектров (С. V. Raman & K. S. Krishnan, A New Type of Secondary Radiation, 121 NATURE 501-502 (1928); Zai-Qing Wen, Raman spectroscopy of protein Pharmaceuticals, 96 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2861-2878 (2007)).

Примерные варианты осуществления изобретения.

Описанные в данном документе варианты осуществления обеспечивают композиции, способы и системы для быстрого получения характеристик белков в образце.

Используемые в данном документе термины "включать", "включает" и "включающий" не предназначены для ограничения и понимаются как означающие "содержать", "включает" и "содержащий", соответственно.

В некоторых примерных вариантах осуществления изобретение предлагает способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в составе, включающий добавление в состав эффективного количества сывороточного альбумина человека.

В некоторых примерных вариантах осуществления изобретение предлагает способ солюбилизации частиц жирных кислот в составе, включающий добавление в состав эффективного количества сывороточного альбумина человека.

В некоторых примерных вариантах осуществления изобретение предлагает состав, содержащий (i) активный фармацевтический агент и (ii) человеческий сывороточный альбумин.

В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления активный фармацевтический ингредиент может быть малой молекулой. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления активный фармацевтический ингредиент может быть белком. В некоторых примерных вариантах осуществления активный фармацевтический ингредиент может быть терапевтическим белком.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может содержать антитело. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления состав может содержать антитело, выбранное из группы, состоящей из моноклонального антитела, поликлонального антитела, фрагментов антител, биспецифического антитела, мультиспецифического антитела или их комбинаций.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может содержать по меньшей мере один активный фармацевтический агент. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления состав может содержать два активных фармацевтических агента.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно использовать для лечения заболевания или расстройства.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно использовать для предотвращения заболевания или расстройства.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту перорально.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту парентеральным путем. В некоторых конкретных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту внутривенным путем. В некоторых конкретных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту подкожным путем. В некоторых конкретных вариантах осуществления состав можно вводить пациенту парентеральным путем.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может быть жидким составом. В некоторых примерных вариантах осуществления количество активного фармацевтического агента в составе может находиться в диапазоне от около 0,01 мг/мл до около 600 мг/мл. В некоторых конкретных вариантах реализации количество активного фармацевтического агента в составе может составлять около 0,01 мг/мл, около 0,02 мг/мл, около 0,03 мг/мл, около 0,04 мг/мл, около 0,05 мг/мл, около 0,06 мг/мл, около 0,07 мг/мл, около 0,08 мг/мл, около 0,09 мг/мл, около 0,1 мг/мл, около 0,2 мг/мл, около 0,3 мг/мл, около 0,4 мг/мл, около 0,5 мг/мл, около 0,6 мг/мл, около 0,7 мг/мл, около 0,8 мг/мл, около 0,9 мг/мл, около 1 мг/мл, около 2 мг/мл, около 3 мг/мл, около 4 мг/мл, около 5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 7 мг/мл, около 8 мг/мл, около 9 мг/мл, около 10 мг/мл, около 15 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 100 мг/мл, около 110 мг/мл, около 120 мг/мл, около 130 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл, около 225 мг/мл, около 250 мг/мл, около 275 мг/мл, около 300 мг/мл, около 325 мг/мл, около 350 мг/мл, около 375 мг/мл, около 400 мг/мл, около 425 мг/мл, около 450 мг/мл, около 475 мг/мл, около 500 мг/мл, около 525 мг/мл, около 550 мг/мл, около 575 мг/мл или около 600 мг/мл.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может быть способен образовывать частицы жирных кислот. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления изобретения частицы жирных кислот могут содержать свободные жирные кислоты. В некоторых других конкретных примерных вариантах осуществления изобретения соотношение молекул свободных жирных кислот к молекулам человеческого сывороточного альбумина составляет от около 6:1 до около 1:1. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления соотношение молекул свободных жирных кислот к молекулам человеческого сывороточного альбумина составляет около 0,5:1, около 0,6:1, около 0,7:1, около 0,8:2, около 0,9:1, около 1:1, около 2:1, около 2:1, около 4:1, около 5:1, около 6:1, около 7:1, около 8:1, около 9:1 или около 10:1. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления частицы жирной кислоты могут содержать олеиновую кислоту.

В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут содержать насыщенные алифатические кислоты с прямой цепью. В некоторых других конкретных примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут содержать насыщенные алифатические кислоты с прямой цепью, содержащие не более двадцати атомов углерода. В некоторых других конкретных примерных вариантах осуществления свободная жирная кислота может включать по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из этановой кислоты, пропановой кислоты, бутановой кислоты, пентановой кислоты, гексановой кислоты, октановой кислоты, нонановой кислоты, декановой кислоты, undекановой кислоты, додекановой кислоты, тридекановой кислоты, тетрадекановой кислоты, пентадекановой кислоты, гексадекановой кислоты, гептадекановой кислоты, октадекановой кислоты, нонадекановой кислоты, эйкозановой кислоты или их комбинации.

В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут содержать ненасыщенные алифатические кислоты с прямой цепью. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления частицы жирных кислот могут содержать ненасыщенные алифатические кислоты с прямой цепью, содержащие не более двадцати атомов углерода. В некоторых примерных вариантах осуществления частицы свободной жирной кислоты могут включать стеарионовую кислоту, линолэлаидиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, вакценовую кислоту, пауллиновую кислоту, элаидиновую кислоту, гондоевую кислоту, олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, миристиновую кислоту, лауриновую кислоту, арахидоновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту и их комбинации.

В некоторых примерных вариантах осуществления концентрация человеческого сывороточного альбумина в составе может составлять по меньшей мере около 2,5 мг/мл. В некоторых конкретных примерных вариантах осуществления изобретения концентрация человеческого сывороточного альбумина в составе может составлять по меньшей мере около 2,5 мг/мл, по меньшей мере около 2,6 мг/мл, по меньшей мере около 2,7 мг/мл, по меньшей мере около 2,8 мг/мл, по меньшей мере около 2,9 мг/мл, по меньшей мере около 3,0 мг/мл, по меньшей мере около 3,1 мг/мл, по меньшей мере около 3,2 мг/мл, по меньшей мере около 3,3 мг/мл, по меньшей мере около 3,4 мг/мл, по меньшей мере около 3,5 мг/мл, 3,6 мг/мл, по меньшей мере около 3,7 мг/мл, по меньшей мере около 3,8 мг/мл, по меньшей мере около 3,9 мг/мл, по меньшей мере около 4,0 мг/мл, по меньшей мере около 4,1 мг/мл, по меньшей мере около 4,2 мг/мл, по меньшей мере около 4,3 мг/мл, по меньшей мере около 4,4 мг/мл, по меньшей мере около 4,5 мг/мл, 4,6 мг/мл, по меньшей мере около 4,7 мг/мл, по меньшей мере около 4,8 мг/мл, по меньшей мере около 4,9 мг/мл, по меньшей мере около 5,0 мг/мл, по меньшей мере около 5,1 мг/мл, по меньшей мере около 5,2 мг/мл, по меньшей мере около 5,3 мг/мл, по меньшей мере около 5,4 мг/мл, по меньшей мере, около 5,5 мг/мл, 5,6 мг/мл, по меньшей мере около 5,7 мг/мл, по меньшей мере около 5,8 мг/мл, по меньшей мере около 5,9 мг/мл, по меньшей мере около 6,0 мг/мл, по меньшей мере около 6,1 мг/мл, по меньшей мере около 6,2 мг/мл, по меньшей мере около 6,3 мг/мл, по меньшей мере около 6,4 мг/мл, по меньшей мере около 6,5 мг/мл, 6,6 мг/мл, по меньшей мере около 6,7 мг/мл, по меньшей мере около 6,8 мг/мл, по меньшей мере около 6,9 мг/мл, по меньшей мере около 7,0 мг/мл, по меньшей мере около 7,1 мг/мл, по меньшей мере около 7,2 мг/мл, по меньшей мере около 7,3 мг/мл, по меньшей мере около 7,4 мг/мл или по меньшей мере около 7,5 мг/мл.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе может снижать образование частиц жирных кислот в составе.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе может солубилизировать частицы жирных кислот в составе.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе может связывать свободные жирные кислоты, образующиеся в результате разложения полисорбата, и связывая их, снижать при этом эффективную концентрацию в растворе до уровней ниже критической концентрации мицеллообразования.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе может служить поглотителем жирных кислот.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе может устранять появление видимых/невидимых частиц жирных кислот.

В некоторых примерных вариантах осуществления человеческий сывороточный альбумин в составе

может продлить срок хранения состава, по сравнению с составом без человеческого сывороточного альбумина.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может дополнительно содержать полисорбат. В некоторых конкретных вариантах осуществления полисорбат может быть выбран из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 65, полисорбата 80 и их комбинаций. В некоторых примерных вариантах осуществления концентрация полисорбата в составе может составлять от около 0,001% мас./об. до около 1% мас./об. В некоторых конкретных вариантах осуществления концентрация полисорбата в составе может составлять около 0,001% мас./об., около 0,002% мас./об., около 0,003% мас./об., около 0,004% мас./об., около 0,005% мас./об., около 0,006% мас./об., около 0,007% мас./об., около 0,008% мас./об., около 0,009% мас./об., около 0,01% мас./об., около 0,011% мас./об., около 0,012% мас./об., около 0,013% мас./об., около 0,014% мас./об., около 0,015% мас./об., около 0,016% мас./об., около 0,017% мас./об., около 0,018% мас./об., около 0,019% мас./об., около 0,02% мас./об., около 0,021% мас./об., около 0,022% мас./об., около 0,023% мас./об., около 0,024% мас./об., около 0,025% мас./об., около 0,026% мас./об., около 0,027% мас./об., около 0,028% мас./об., около 0,029% мас./об., около 0,03% мас./об., около 0,031% мас./об., около 0,031% мас./об., около 0,032% мас./об., около 0,033% мас./об., около 0,034% мас./об., около 0,035% мас./об., около 0,036% мас./об., около 0,037% мас./об., около 0,038% мас./об., около 0,039% мас./об., около 0,04% мас./об., около 0,041% мас./об., около 0,042% мас./об., около 0,043% мас./об., около 0,044% мас./об., около 0,045% мас./об., около 0,046% мас./об., около 0,047% мас./об., около 0,048% мас./об., около 0,049% мас./об., около 0,05% мас./об., около 0,051% мас./об., около 0,052% мас./об., около 0,053% мас./об., около 0,054% мас./об., около 0,055% мас./об., около 0,056% мас./об., около 0,057% мас./об., около 0,058% мас./об., около 0,059% мас./об., около 0,06% мас./об., около 0,061% мас./об., около 0,062% мас./об., около 0,063% мас./об., около 0,064% мас./об., около 0,065% мас./об., около 0,066% мас./об., около 0,067% мас./об., около 0,068% мас./об., около 0,069% мас./об., около 0,07% мас./об., около 0,071% мас./об., около 0,072% мас./об., около 0,073% мас./об., около 0,074% мас./об., около 0,075% мас./об., около 0,076% мас./об., около 0,077% мас./об., около 0,078% мас./об., около 0,079% мас./об., около 0,08% мас./об., около 0,081% мас./об., около 0,082% мас./об., около 0,083% мас./об., около 0,084% мас./об., около 0,085% мас./об., около 0,086% мас./об., около 0,087% мас./об., около 0,088% мас./об., около 0,089% мас./об., около 0,09% мас./об., около 0,091% мас./об., около 0,092% мас./об., около 0,093% мас./об., около 0,094% мас./об., около 0,095% мас./об., около 0,096% мас./об., около 0,097% мас./об., около 0,098% мас./об., около 0,099% мас./об. или около 1% мас./об.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может дополнительно содержать фермент липазу.

В некоторых примерных вариантах осуществления состав может дополнительно содержать полисорбат и фермент липазу, при этом фермент липаза может гидролизовать полисорбат с образованием частиц жирной кислоты.

В настоящем изобретении цитируются различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих цитируемых работ полностью включена в данный документ посредством ссылки во всех целях.

Настоящее изобретение станет более понятным со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения.

#### Примеры

Подготовка материалов и реагентов. Все реакции проводили в водном буферном растворе, содержащем 25 мМ Трис, рН 7,5, 100 мМ KCl, 20 мМ CaCl<sub>2</sub> (буфер ТКС), если иное не указано. Липазу из *Chromobacterium viscosum* приобретали у EMD Millipore (Биллерика, Массачусетс); лиофилизированный

свободный от жирных кислот человеческий сывороточный альбумин (FAF-HSA) и человеческая сыворотка были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Суперочищенный полисорбат 20 (PS20) и полисорбат 80 (PS80) были получены от Croda (Эдисон, Нью-Джерси). Для экспериментов с IgG человеческий лиофилизированный поликлональный IgG, приобретенный у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури), был восстановлен в соответствии с рекомендациями производителя с помощью 150 мМ NaCl и 35 мМ Tris pH 8,0 и обессолен на спин-обессоливающей колонке Zeba (Thermo Fisher Scientific), уравновешенной с 25 мМ Tris, 100 мМ KCl, pH 7,5

Очистка реагентов. Лиофилизированную липазу из *C. Viscosum* восстанавливали приблизительно в 1 мл реакционного буфера ТКС и очищали на колонке Superdex Increase 200 10/300 SEC, уравновешенной тем же буфером. Очищенные фракции липазы объединяли, и концентрацию белка (4,2 мг/мл) определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop One C при УФ  $\lambda_{=280 \text{ нм}}$  с использованием коэффициента экстинкции 0,95. Аликвоты хранили в 10% (об./об.) глицерине при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Концентрацию FAF-HSA определяли с помощью Nanodrop OneC при УФ  $\lambda_{=280 \text{ нм}}$  с использованием коэффициента экстинкции 0,531.

Обнаружение частиц путем измерения мутности. Для обнаружения присутствия частиц путем отслеживания поглощения при 450 нм, как правило, в течение 2-4 часов, использовали планшетный анализ. Анализ обнаруживает частицы размером более чем 20 нм, основываясь на фундаментальных принципах светорассеяния (оценка мутности). Очищенную липазу добавляли к буферу ТСК, содержащему 0,1% полисорбат 80, при конечной концентрации от 0,4 до 5 мкг/мл. Оптическую плотность измеряли с 5-минутными интервалами при периодическом встряхивании с использованием планшета-ридера Spectra Max 340, при постоянной температуре  $25^{\circ}\text{C}$ . Базовые значения были установлены путем измерения поглощения 0,1%-ного раствора полисорбата 80 без добавления липазы. Управление прибором, сбор данных и анализ выполнялись с помощью программного обеспечения SoftMax Pro (версия 6.5).

Был проведен скрининг нескольких различных липаз млекопитающих, грибов и бактерий полученных из коммерческих источников. Выбор бактериальной липазы в значительной степени основан на быстром гидролизе полисорбата и последующем образовании частиц, что дает явное преимущество для определения условий для контроля образования частиц, что может занять от нескольких месяцев до нескольких лет в случае биотерапевтического лекарственного препарата. Кроме того, бактериальная липаза поддается воздействию более широкого диапазона условий раствора, которые сильно влияют на образование частиц. В частности, важно присутствие калия, помогающего нейтрализовать электростатическое отталкивание кислотных головных групп.

Пример 1. Гидролиз полисорбата 80 липазой из *Chromobacterium viscosum* с образованием частиц.

Формирование частиц в растворах, содержащих PS80, может происходить из-за гидролиза липазами (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in the Sulfatase Drug Product Prading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016)).

Образование частиц - это многостадийный процесс: во-первых, липаза катализирует гидролиз PS80 по сложноэфирной связи жирной кислоты с высвобождением сорбитанового кольца и цепи жирной кислоты; во-вторых, множество свободных жирных кислот агрегируют с образованием частиц. Для определения активности липазы из *Chromobacterium viscosum*, 0,1% PS80 инкубировали с различными концентрациями липазы от 0,4 до 5 мкг/мл и в течение нескольких часов отслеживали поглощение при 450 нм.

Чтобы обнаружить присутствие частиц в растворе, мутность образца отслеживали с помощью спектроскопии поглощения. Образцы инкубировали при  $25^{\circ}\text{C}$  и измеряли поглощение при 450 нм в течение 120 минут. Использовали различные концентрации липазы от 0 до 1 мкг. Образец, не содержащий липазы, использовали в качестве контроля.

Увеличение сигнала при 450 нм указывает на увеличение мутности раствора, которое объясняется образованием частиц. На фиг. 1 показано, что увеличение концентрации липазы привело как к повышенной конечной мутности, так и к уменьшению времени, необходимого для наблюдения начального увеличения дозозависимого ответа. Кроме того, образец, не содержащий липазы, который использовали в качестве контроля (открытые треугольники), не увеличивал мутность с течением времени и обеспечивал базовый уровень поглощения.

Пример 2. Идентификация состава образующихся частиц.

### 2.1 Получение частиц.

Частицы получали путем инкубации липазы с концентрацией 2,5 мкг/мл с PS80 в ТСК-буфере при комнатной температуре в течение 3 часов с последующим центрифугированием. Супернатант удаляли, а осадок промывали один раз буфером и восстанавливали обработкой ультразвуком. Для образования частиц в присутствии IgG добавляли поликлональный IgG человека до конечной концентрации 7,5 мг/мл. Механически диспергируемые гранулы осаждали на поликарбонатных мембранных фильтрах с размером пор 5 мкм (RapID; onmoMuth Junction, NJ). Рамановскую спектроскопию проводили на частице с использованием RapID Single Particle Explorer с помощью монохроматического лазера с длиной волны 785 нм при 100% интенсивности/10 секундном времени экспозиции в объективе 50x для создания спектров, характерных для образца.

## 2.2 Рамановская спектроскопия.

Рамановскую спектроскопию использовали для идентификации составляющих частиц после инкубации липазы с PS80. В этом методе используется неупругое рассеяние света для создания энергетического спектра, уникального для каждой молекулы, который затем сравнивается с эталонной библиотекой, содержащей скелетные колебания различных химических структур. Было установлено, что рамановские спектры 156 из 200 частиц очень похожи на спектр олеиновой кислоты (фиг. 2). Черная линия, показанная на фиг. 2 - олеиновая кислота внутреннего стандарта. Пик при  $1650\text{ см}^{-1}$  прямо пропорционален количеству связей C=C в линейной углеводородной цепи и, таким образом, является признаком ненасыщенной углеводородной цепи олеиновой кислоты. Другие идентифицированные молекулы включали лауриновую кислоту и пальмитиновую кислоту, которые также являются продуктами разложения полисорбата.

### Пример 3. Предотвращение образования частиц с помощью HSA.

HSA содержит несколько участков связывания с высокой и низкой аффинностью к жирным кислотам и, следовательно, может действовать как поглотитель жирных кислот, который может ингибировать образование частиц при гидролизе полисорбата. Для того, чтобы проверить эффективность HSA в предотвращении образования частиц, 0,1% PS80 инкубировали с 0,5 мкг липазы в присутствии возрастающих концентраций FAF-HSA при  $25^\circ\text{C}$ , и мутность раствора отслеживали путем измерения поглощения при 450 нм в течение шести часов.

На фиг. 3 показан график зависимости поглощения от времени при 450 нм для различных концентраций FAF-HSA. Образец без FAF-HSA (незакрашенные ромбики) обеспечивает верхний предел поглощения ( $\sim 0,4$  нм). Как видно на фиг. 3, влияние HSA на внешний вид частиц было дозозависимым ответом, при этом планки погрешностей представляют стандартную погрешность для двух повторов. Контрольный образец не содержал FAF-HSA и показал конечное поглощение около 0,4 ОП через 6 часов. Добавление FAF-HSA привело как к снижению конечного поглощения (более низкая мутность), так и к временной задержке начала помутнения зависимым от концентрации образом. Примечательно, что образцы, содержащие 7,5 мг/мл FAF-HSA, не показали какого-либо заметного поглощения за этот период времени. Аналогичные результаты были получены с PS20 вместо PS80 (данные не показаны).

### Пример 4. Частичное насыщение участков связывания жирных кислот предотвращает образование частиц HSA.

Для дополнительного определения молекулярного механизма, с помощью которого HSA ингибирует образование частиц, было выполнено измерение изменений мутности в растворах, содержащих HSA, которые предварительно инкубировали со стеариновой кислотой в стехиометрическом соотношении с тремя сайтами связывания с высокой аффинностью связывания. Хотя олеиновая кислота могла бы быть более прямым сравнением, растворимость мононенасыщенной жирной кислоты делает его сложным, сводя к минимуму перенос свободной жирной кислоты в образцы; поэтому стеариновая кислота, насыщенная молекула с эквивалентным количеством углеводов, была выбрана в качестве сопоставимого заменителя.

HSA, нагруженный стеариновой кислотой (SA-HSA), получали путем добавления 70 мМ чистой стеариновой кислоты (Sigma) в этаноле к FAF-HSA в молярном соотношении 3:1, инкубации при комнатной температуре в течение 30-60 минут при  $25^\circ\text{C}$ , с последующим центрифугированием при 22000 gcf в течение 4 минут для осаждения несвязанной стеариновой кислоты и добавлением 0,5 мг липазы и 0,1% PS80, и измерения поглощения при 450 нм в течение шести часов.

График на фиг. 4 отображает поглощение при 450 нм как функцию времени для различных концентраций SA-HSA, а образец без SA-HSA (светлые кружки) предоставляет верхний предел поглощения ( $\sim 0,5$ ), в то время как планки погрешностей представляют стандартную погрешность для трех повторов.

В то время как FAF-HSA демонстрировал дозозависимое снижение мутности с полным ингибированием при 7,5 мг/мл, увеличение мутности было обнаружено во всех образцах, содержащих SA-HSA, что указывает на то, что образование частиц не ингибировалось (фиг. 4). Кроме того, время, необходимое для начала помутнения, было меньше по сравнению с образцами, содержащими эквивалентные количества FAF-HSA (фиг. 3).

### Пример 5. Замедление образования частиц в препарате антитела без HSA.

Замедление образования частиц оказалось прямо пропорциональным концентрации HSA, добавляемой к смеси полисорбат/липаза; однако возможность того, что какой-либо белок может неспецифически предотвратить образование частиц, осталась. Чтобы определить, является ли этот эффект специфическим для HSA или может быть общим свойством любого вида белка, HSA заменяли человеческим поликлональным IgG, вторым по распространенности циркулирующим сывороточным белком (N. Leigh Anderson & Norman G. Anderson, *The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects*, 1 Molecular & Cellular Proteomics 845-867 (2002), и растворы отслеживали в отношении мутности с течением времени.

Для экспериментов с IgG человеческий поликлональный IgG, приобретенный у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури), был восстановлен с использованием 150 мМ NaCl и 35 мМ Трис, pH 8,0 в соответствии с рекомендациями производителя и обессолен на спиновой обессоливающей колонке Zeba



(Thermo Fisher Scientific), уравновешенной 25 мМ Трис, 100 мМ KCl и pH 7,5.

Чтобы проверить специфичность замедления образования частиц жирных кислот в отношении HSA, различные концентрации человеческого поликлонального IgG добавляли к раствору, содержащему 0,5 мкг липазы и 0,1% PS80, при 25°C, и отслеживали поглощение при 450 нм в течение шести часов.

Образец положительного контроля с липазой и PS80, но без IgG (фиг. 5, незакрашенные ромбики) использовали для получения верхнего предела поглощения (~0,5). Образец с PS80 и 10 мг/мл IgG, но без липазы (красные треугольники) использовали для получения отрицательного контроля, который показывает исходное поглощение при 450 нм.

В отличие от снижения мутности, наблюдаемого для образцов, содержащих FAF-HSA, все образцы, содержащие поли-IgG, быстро показали увеличение поглощения, что указывает на то, что он не предотвращает образование частиц (фиг. 5). Неожиданно, кажущийся уровень мутности показал умеренное зависящее от концентрации поли-IgG увеличение по сравнению с положительным контролем, не содержащим IgG; однако трудно определить, было ли увеличение поглощения вызвано увеличением количества частиц или увеличением среднего размера частиц. Агрегацию не наблюдали в отрицательном контроле (фиг. 5, красные треугольники).

Увеличение мутности, вероятно, может быть связано с лиофилизацией белка. Чтобы определить, связано ли увеличение мутности со способом, которым белок был обработан (т. е. лиофилизирован), получали mAb в состоянии раствора двумя способами; один, который не был изменен по сравнению с состоянием очищенного раствора, и тот, который имитировал процесс лиофилизации производителя, используемый для препарата поли-IgG. Моноклональные антитела лиофилизировали и восстанавливали в соответствии с инструкциями производителя для поликлональных IgG для воспроизведения обработки, а затем добавляли к раствору, содержащему 0,5 мкг липазы и 0,1% PS80, при 25°C и отслеживали поглощение при 450 нм в течение шести часов. Панель А на фиг. 6 показывает моноклональное антитело, которое не было лиофилизировано. Панель В на фиг. 6 показывает то же моноклональное антитело, которое было лиофилизировано. Графики отображают поглощение при 450 нм как функцию времени для различных концентраций моноклонального IgG. Положительный контрольный образец с липазой и PS80, но без IgG (закрашенные ромбики) обеспечивает верхний предел поглощения (~0,55). Отрицательный контрольный образец с PS80 и 10 мг/мл IgG, но без липазы (красные треугольники), показывает исходное поглощение при 450 нм. Лيوфилизированный материал показал такой же рост, как и у поли-IgG, демонстрируя, что этот рост, вероятно, был вызван процессом лиофилизации.

Пример 6. Замедление образования частиц в препарате антител с HSA *in-vitro*

Чтобы оценить, может ли HSA уменьшить образование частиц в присутствии поликлонального IgG, был проведен анализ с увеличивающимися концентрациями поликлонального IgG, тест с HSA, поликлональным IgG, липазой и PS80.

4,5 мг/мл FAF-HSA и 7,5 мг/мл FAF-HSA добавляли к образцам, содержащим поликлональный IgG, 0,5 мкг липазы и 0,1% PS80, при 25°C, и отслеживали поглощение при 450 нм в течение шести часов.

На фиг. 7 показан график зависимости поглощения от времени при 450 нм при добавлении 4,5 мг/мл FAF-HSA (панель А) и 7,5 мг/мл FAF-HSA к различным концентрациям поликлонального IgG в соответствии с примерным вариантом осуществления. Положительный контрольный образец с липазой и PS80, но без IgG (закрашенные ромбики) обеспечивает верхний предел поглощения (~0,5), а планки погрешностей представляют стандартную погрешность для двух повторов.

Активность HSA в отношении ингибирования частиц была аналогична активности, наблюдаемой в отсутствие поликлонального IgG (фиг. 3), что указывает на то, что HSA ингибирует образование частиц даже в присутствии другого сывороточного белка.

Пример 7. Замедление образования частиц в препарате антител с HSA *in-vivo*

Описанный выше быстрый анализ опосредованного липазой образования и обнаружения частиц продемонстрировал, что HSA может предотвращать образование частиц *in vitro*. В качестве первого шага к более подходящим условиям *in vivo* оценивали, может ли HSA сольбилизовать уже существующие частицы.

Чтобы проверить способность HSA сольбилизовать уже сформированные частицы в растворе, были приготовлены частицы (см. "Материалы и методы") и разбавлены для получения максимального поглощения ~0,5 ОП. Предварительно сформированные частицы инкубировали с FAF-HSA, и контролировали поглощение при 450 нм в течение шести часов, как показано на фиг. 8 (отображенные данные соответствуют 2,5 часа). Положительный контрольный образец с липазой и PS80, но без HSA (фиг. 8, закрашенные треугольники) обеспечивает верхний предел поглощения (~0,5). Отрицательный контрольный образец с PS80 и 7,5 мг/мл HSA, но без липазы (фиг. 8, красные треугольники), показывает исходное поглощение при 450 нм, а планки погрешностей представляют стандартную погрешность для трех повторов.

При добавлении FAF-HSA к растворам, содержащим повышенные уровни частиц жирных кислот, мутность раствора быстро снижалась; однако не все концентрации FAF-HSA достигли исходного уровня (фиг. 8). Плато, наблюдаемое при концентрациях HSA, меньших или равных 3,5 мг/мл, указывает на то, что ранее сформированные частицы не были полностью сольбилизованы. Концентрации HSA выше

5,5 мг/мл были необходимы для полного разрушения ранее сформированных частиц в пределах анализа мутности.

Пример 8. Замедление образования частиц в препарате антител с HSA in-vivo с сывороткой человека

Подобные эксперименты, как в примере 7, были также выполнены с сывороткой человека, которая более точно отражает физиологические условия. В частности, альбумин, присутствующий в сыворотке крови, связан с множеством различных соединений с низкой растворимостью.

Ранее сформированные частицы инкубировали с нормальной сывороткой человека, и поглощение при 450 нм отслеживали в течение шести часов, как показано на фиг. 9 (показаны данные до 2,5 часов, поскольку дальнейших изменений не наблюдалось). Положительный контрольный образец с липазой и PS80, но без сыворотки (открытые треугольники) обеспечивает верхний предел поглощения (~0,6). Был включен отрицательный контрольный образец с PS80 и 21% сывороткой человека, но без липазы, который показал поглощение 0,25 ОП, а планки погрешностей представляют стандартную погрешность для трех повторов. Из-за исходного поглощения сыворотки человека каждую концентрацию сыворотки также анализировали без липазы, PS80 или частиц, и результаты, показанные на фиг. 9, отображают вычитаемые фоновые сигналы.

Хотя все образцы, содержащие сыворотку, демонстрировали снижение мутности, только образцы с содержанием сыворотки не менее 14% смогли продемонстрировать исходный уровень, указывающий на практически полное отсутствие частиц в течение 1,5 часов. Предполагая, что верхний предел альбумина в сыворотке крови человека составляет 50 мг/мл, это соответствует около 7,5 мг/мл альбумина в соответствии с количеством FAF-HSA, необходимым для получения нулевого исходного уровня мутности.

Таким образом, было обнаружено новое и потенциально полезное применение человеческого сывороточного альбумина в биофармацевтической промышленности. HSA может замедлять образование частиц жирных кислот, что указывает на то, что включение HSA в качестве эксципиента может помочь продлить срок хранения определенных полисорбатсодержащих лекарственных продуктов. Важно отметить, что HSA может также солюбилизировать уже существующие частицы в растворе, предполагая, что физиологические концентрации HSA могут эффективно и действительно устранять частицы, если они присутствуют, после введения лекарственного продукта.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ предотвращения или уменьшения образования частиц жирных кислот в содержащем полисорбат лекарственном составе, способном образовывать частицы жирных кислот, включающий:

(a) получение состава, включающего активный фармацевтический агент, полисорбат и по меньшей мере одну липазу, где указанный состав способен образовывать частицы жирных кислот; и

(b) добавление в состав эффективного количества человеческого сывороточного альбумина, причем концентрация человеческого сывороточного альбумина в составе составляет по меньшей мере 5,5 мг/мл.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что частицы жирной кислоты содержат свободную жирную кислоту.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что частицы жирной кислоты содержат свободную жирную кислоту, выбранную из группы, состоящей из олеиновой кислоты, пальмитиновой кислоты, стеариновой кислоты, миристиновой кислоты, лауриновой кислоты и их комбинаций.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ уменьшает образование частиц жирных кислот, содержащих свободную жирную кислоту с содержанием от шести до двадцати двух атомов углерода.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что состав является парентеральным составом.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ уменьшает количество частиц жирных кислот, которые образуют видимые или невидимые частицы.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что эффективное количество человеческого сывороточного альбумина включает один моль человеческого сывороточного альбумина, связывающегося по меньшей мере с половиной моля свободной жирной кислоты, содержащейся в частицах жирной кислоты.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что способ способен снижать образование частиц жирных кислот, имеющих размер по меньшей мере 10 мкм.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что дополнительно включает использование рамановской спектроскопии для обнаружения частиц жирных кислот.

10. Способ по п.2, отличающийся тем, что полисорбат выбран из группы, состоящей из полисорбата 20, полисорбата 40, полисорбата 60, полисорбата 80 и их комбинации.

11. Способ по п.2, отличающийся тем, что концентрация полисорбата в составе составляет от 0,001% мас./об. до 1% мас./об.

12. Способ по п.3, отличающийся тем, что дополнительный белок является антителом.

13. Способ по п.3, отличающийся тем, что дополнительный белок является моноклональным антителом.

14. Способ по п.3, отличающийся тем, что дополнительный белок является поликлональным анти-

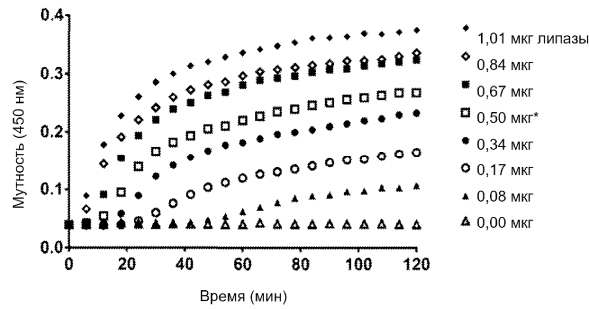
телом.

15. Способ по п.5, отличающийся тем, что соотношение молекул свободных жирных кислот к молекулам человеческого сывороточного альбумина в составе составляет от 6:1 до 1:1.

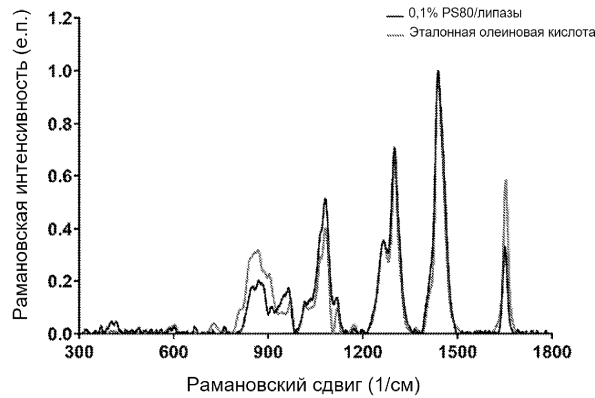
16. Способ солубилизации частиц жирных кислот, образованных в содержащем полисорбат лекарственном составе, включающий:

(а) получение состава, включающего активный фармацевтический агент, полисорбат и по меньшей мере одну липазу, где указанный состав способен образовывать частицы жирных кислот; и

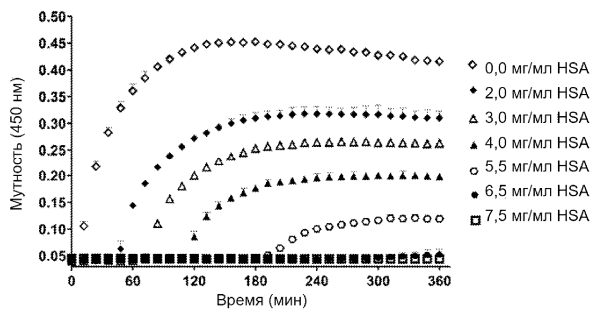
(б) добавление в состав эффективного количества человеческого сывороточного альбумина, причем концентрация человеческого сывороточного альбумина в составе составляет по меньшей мере 5,5 мг/мл.



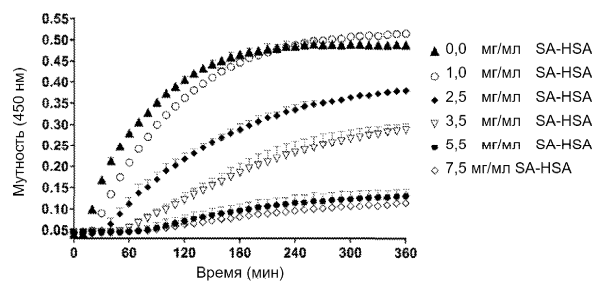
Фиг. 1



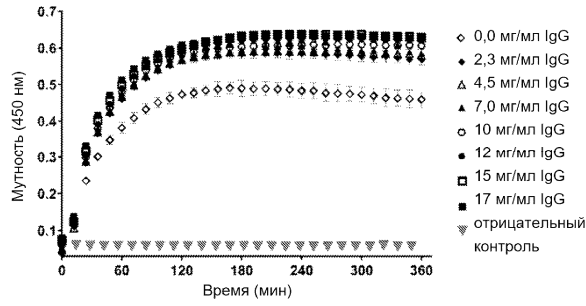
Фиг. 2



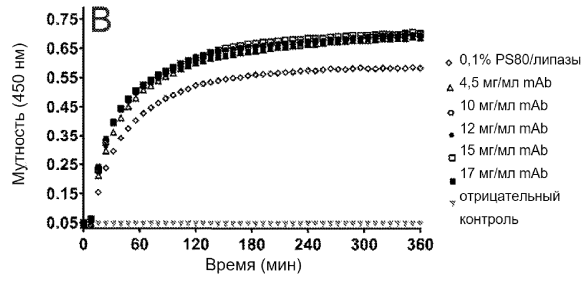
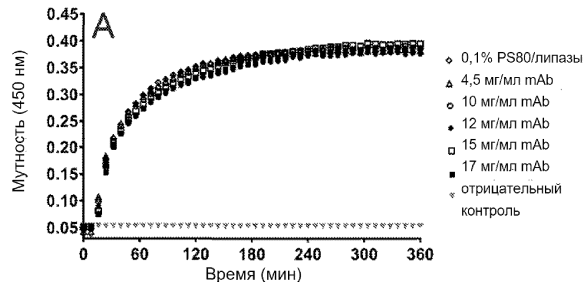
Фиг. 3



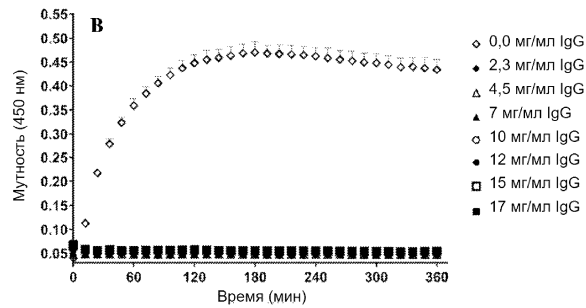
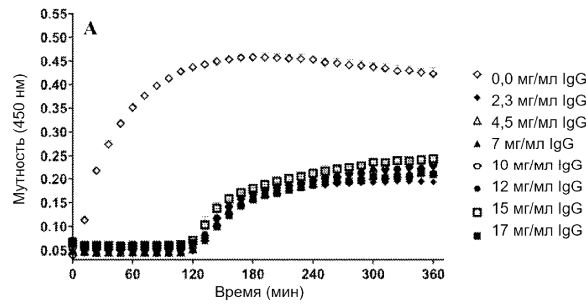
Фиг. 4



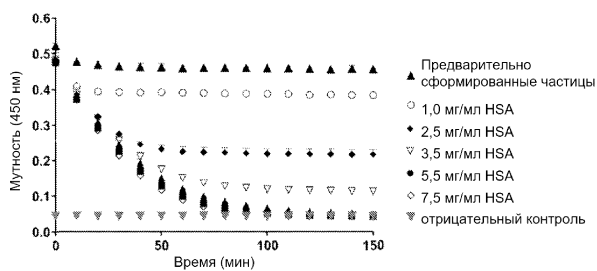
Фиг. 5



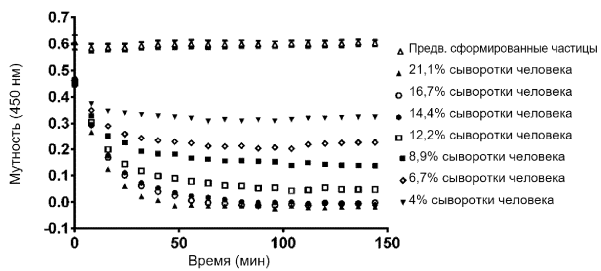
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

