

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490934 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.02

(22) Дата подачи заявки
2022.10.12

(51) Int. Cl. *A61K 47/18* (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭФРУКСИФЕРМИНА

(31) 63/255,286

(32) 2021.10.13

(33) US

(86) PCT/US2022/077968

(87) WO 2023/064808 2023.04.20

(71) Заявитель:
АКЕРО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Димитрова Мариана Н., Рольф
Тимоти П. (US), Айзеле Симон,
Бостик Джеймс (DE)

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

(57) В изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие эфруксифермин, способы получения лиофилизированных композиций и способы применения для лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), алкогольного стеатогепатита (АСГ), алкогольной болезни печени (АБП) или алкогольной жировой болезни печени (АЖБП), диабета 2 типа, ожирения, гипертриглицеридемии, дислипидемии, заболевания, вызываемого неправильным сворачиванием белка, связанных с алкоголем и других пристрастий или зависимостей, реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, нормализации содержания жира в печени, снижения повышенного уровня глюкозы в крови, повышения чувствительности к инсулину и/или снижения уровней мочевой кислоты.

A1

202490934

202490934

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581095EA/025

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ЭФРУКСИФЕРМИНА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/255286, поданной 13 октября 2021 г., содержание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[0002] Посредством ссылки в полном объеме включен машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, поданный вместе с данным документов и идентифицируемый следующим образом: 50011_Seqlisting.XML; размер: 2497 байт; создан: 9 октября 2022 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эфруксифермин (EFX), способам получения лиофилизированной композиции и способам применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Фактор роста фибробластов 21 (FGF21) представляет собой эндокринный гормон, который действует на печень, поджелудочную железу, мышцы и жировую ткань, регулируя метаболизм липидов, углеводов и белков. Действуя как паракринный гормон, человеческий FGF21 также играет критическую роль в защите клеток от стресса. Эти свойства делают агонизм FGF21 привлекательным терапевтическим механизмом, однако применение нативного FGF21 ограничено из-за его короткого времени полужизни в кровотоке. Слитый белок Fc-FGF21, эфруксифермин (EFX), был генетически сконструирован, чтобы увеличить время полужизни человеческого FGF21 (Hecht et al, PLoS One 2012; 7(11): e49345; Stanislaus et al., Endocrinology. 2017;158(5):1314-1327). Однако составы EFX подвержены посттрансляционным модификациям, включая образование зарядовых и размерных вариантов, что приводит к ограничению стабильности. В данной области техники существует потребность в фармацевтических композициях, которые обеспечивают увеличение стабилизации и уменьшение посттрансляционных модификаций слитых белков Fc-FGF21, таких как эфруксифермин (EFX).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эфруксифермин (EFX), сахар, от около 20 до около 200 mM аргинина/аргинина-HCl или аргинина/глутаминовой кислоты и поверхностно-активное вещество. В различных аспектах композиция имеет pH от около 6,9 до около 8,1. В различных аспектах сахар композиции представляет собой сахарозу, глюкозу, фруктозу или мальтозу. Необязательно, поверхностно-активное вещество композиции представляет собой полисорбат-20 или полисорбат-80. В различных аспектах фармацевтическая композиция

содержит около 25-150 мг/мл EFX; около 120 мМ сахарозы; около 120 мМ аргинина/аргинина-НСl; около 0,06% по массе/объему (масс./об.) полисорбата-20; и около 20 мМ Трис-НСl. Необязательно, рН композиции составляет около 7,3.

[0006] Композиция по изобретению в различных случаях является лиофилизированной, хотя это не обязательно. В связи с этим в изобретении предложен способ восстановления лиофилизированной композиции, описанной в данном документе, за пять минут и введения восстановленной композиции субъекту. В различных вариантах осуществления восстановленную композицию поддерживают при комнатной температуре в течение до 10 минут. В изобретении также предложено двухкамерное устройство, содержащее любую из композиций, описанных в данном документе, и разбавитель. В определенных аспектах разбавитель представляет собой воду для инъекций или буферный агент (например, составленный буфер на основании составов, описанных в данном документе).

[0007] В изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая EFX, 2,9% L-лизина, 0,008% по массе/объему (масс./об.) полисорбата-20 и 10 мМ Трис. В различных аспектах композиция имеет рН $7,8 \pm 0,3$.

[0008] В связи с этим в изобретении предложен способ получения лиофилизированных композиций. В различных аспектах способ включает следующие этапы: (а) заморозка композиции, описанной в данном документе; (b) отжиг композиции этапа (а) при температуре от около $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ до около $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$; (с) первичная сушка продукта этапа (b) и d) вторичная сушка продукта этапа (с).

[0009] В изобретении дополнительно предложен (а) способ лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), алкогольного стеатогепатита (АСГ), алкогольной болезни печени (АБП) или алкогольной жировой болезни печени (АЖБП), диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии, связанных с алкоголем и других пристрастий или зависимостей или заболеваний, вызываемых неправильным сворачиванием белка, у нуждающегося в этом субъекта; (b) способ нормализации содержания жира в печени субъекта; (с) способ реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка; (d) способ снижения уровня глюкозы в крови и/или повышения чувствительности к инсулину у субъекта; и (е) способ снижения уровней мочевой кислоты у субъекта. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, описанной в данном документе.

[0010] Подразумевается, что вышеприведенное краткое описание сущности изобретения не определяет каждый аспект изобретения, при этом дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как «Подробное описание». Подразумевается, что весь документ следует рассматривать как единое раскрытие, при этом необходимо понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков, даже если эти комбинации признаков не встречаются вместе в одном предложении, или

параграфе, или разделе этого документа. Кроме того, изобретение включает, в качестве дополнительного аспекта, все аспекты изобретения, имеющие более узкий объем, чем вариации, конкретно упомянутые выше.

[0011] Если в данном документе не указано иное, подразумевается, что научные и технические термины, используемые в связи с настоящей заявкой, имеют значения, которые являются общеизвестными для специалиста в данной области техники. Кроме того, если иное не следует из контекста, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Термины «содержащий», «имеющий» и «включающий» следует понимать как неограничивающие термины, если не указано иное. Если аспекты изобретения описаны как «включающие» признак, также предполагается, что эти аспекты «состоят из» или «состоят преимущественно из» этого признака. Использование любых и всех примеров или вводных слов (например, «такой как»), приведенных в данном документе, предназначено исключительно для того, чтобы лучше проиллюстрировать изобретение, и не ограничивает объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не следует толковать как указывающие какой-либо не заявленный элемент как существенный для практической реализации изобретения. За исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества, следует понимать как модифицируемые во всех случаях термином «около» в том смысле, в котором этот термин интерпретировал бы специалист в данной области техники. Что касается аспектов изобретения, описанных или заявленных с использованием терминов в единственном числе, следует понимать, что эти термины означают «один или более», если контекст однозначно не требует более ограниченного значения. Что касается элементов, описанных как один или более в рамках группы, следует понимать, что предусмотрены все комбинации в рамках группы.

[0012] Также следует понимать, что при описании диапазона значений в изобретении подразумеваются отдельные значения, находящиеся в этом диапазоне. Например, «рН от около 6 до около рН 8» может соответствовать, но не ограничивается этим, рН 6,1, 6,6, 7,2, 7,5 и т. д. и любому значению между этими значениями. В любом из диапазонов, описанных в данном документе, в диапазон включены его конечные точки. Однако в описании также предусмотрены такие же диапазоны, из которых исключена нижняя и/или верхняя конечная точка. При использовании термина «около», он означает указанное число плюс или минус 5%, 10% или более от указанного числа. Фактическое предполагаемое отклонение можно определить из контекста.

[0013] Дополнительные признаки и вариации изобретения станут очевидны для специалистов в данной области техники из полного текста этой заявки, включая фигуры и подробное описание, при этом все такие признаки считаются аспектами изобретения. Аналогично, признаки изобретения, описанные в данном документе, можно повторно комбинировать в дополнительные аспекты, которые также считаются аспектами изобретения, независимо от того, указана ли комбинация признаков как аспект

изобретения. Подразумевается, что весь документ следует рассматривать как единое раскрытие, при этом необходимо понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков (даже если они описаны в отдельных разделах), даже если эти комбинации признаков не встречаются вместе в одном предложении, или параграфе, или разделе этого документа. Кроме того, только те ограничения, которые описаны в данном документе как критически важные для изобретения, следует рассматривать как таковые; вариации изобретения, в которых отсутствуют ограничения, не описанные в данном документе как критически важные, считаются аспектами изобретения. Использование заголовков разделов предназначено исключительно для удобства чтения; следует понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На **Фиг. 1** показана схематическая структура EFX с дисульфидными связями и полипептидными цепями.

[0015] На **Фиг. 2А-2В** показаны визуально наблюдаемое образование геля и шлирен-разделение фаз EFX в различных составах при $\text{pH} \leq 6,5$.

[0016] На **Фиг. 3** показана исходная динамическая вязкость EFX 100 мг/мл в составах от F1 до F20 (за исключением F11) при скорости сдвига 400 c^{-1} и в нулевой момент времени.

[0017] На **Фиг. 4А-4В** показана исходная динамическая вязкость EFX в составах от F1 до F20 (за исключением F11) после 3 дней при $40 \text{ }^\circ\text{C}$ /относительной влажности (ОВ) 75% в последующим хранением в течение 21 месяца при $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$ при скорости сдвига 10 c^{-1} (**Фиг. 4В** представляет увеличение в диапазоне от 0 до 50 сП).

[0018] **Фиг. 5А-5С.** На **Фиг. 5А** проиллюстрирован EFX в составах, предрасположенных к гелеобразованию и фазовому разделению, демонстрирующий неньютоновский эффект сдвигового разжижения. На **Фиг. 5В и 5С** показано, что композиции, характеризуемые низкой вязкостью при $\text{pH} \geq 6,5$, напротив, демонстрировали ньютоновское поведение.

[0019] На **Фиг. 6** проиллюстрирована типовая АО-ВЭЖХ-хроматограмма EFX в Трис/Lys составе F18.

[0020] На **Фиг. 7** показано распределение зарядовых вариантов в составе EFX F18, разделенных с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (кИЭФв).

[0021] **Фиг. 8А-8С.** На **Фиг. 8А** показано образование зарядовых вариантов EFX, измеренных с помощью АО-ВЭЖХ как функция от времени при $25 \text{ }^\circ\text{C}$ в различных составах. EFX в F33 демонстрирует наименьшую скорость потери чистоты (как % площади основного пика) с течением времени. На **Фиг. 8В** проиллюстрировано относительное количество в процентах общей площади основных зарядовых вариантов (пре-пики) по данным АО-ВЭЖХ в нулевой момент времени и через 1 месяц при $25 \text{ }^\circ\text{C}/60\% \text{ ОВ}$ для составов от F1 до F20. На **Фиг. 8С** проиллюстрировано относительное

количество в процентах общей площади кислотных зарядовых вариантов (пост-пики) по данным АО-ВЭЖХ в нулевой момент времени и через 1 месяц при 25 °С/60% ОВ для составов от F1 до F20.

[0022] На **Фиг. 9** показано образование зарядовых вариантов EFX, измеренных с помощью АО-ВЭЖХ как функция от времени. Анализ проводили при целевой температуре 5 °С, что обеспечивает результаты, которые являются репрезентативными для температурного диапазона 2-8 °С. EFX в F33 демонстрирует наименьшую скорость потери чистоты (как % площади основного пика) с течением времени.

[0023] На **Фиг. 10** проиллюстрирован профиль эксклюзионной ВЭЖХ для EFX в составе F18.

[0024] На **Фиг. 11** показано образование размерных вариантов (ВММ, НММ) EFX при хранении при 25 °С, количественно оцененное с помощью ЭХ-ВЭЖХ различных составов. EFX в F33 демонстрировал наименьшую скорость потери чистоты за неделю тестирования составов.

[0025] На **Фиг. 12** показано образование размерных вариантов (ВММ, НММ) EFX при хранении при 2-8 °С, количественно оцененное с помощью ЭХ-ВЭЖХ различных составов. EFX в F33 демонстрировал наименьшую скорость потери чистоты в тестируемых составах.

[0026] На **Фиг. 13** приведена типовая электроферограмма КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях для EFX (F18).

[0027] На **Фиг. 14** показаны размерные варианты (ВММ, НММ) EFX по данным КЭ-ДСН (в невосстанавливающих условиях) в различных составах во время хранения при 25 °С. EFX в F33 демонстрировал наименьшую скорость потери чистоты в тестируемых составах.

[0028] На **Фиг. 15** показаны размерные варианты EFX по данным КЭ-ДСН (в невосстанавливающих условиях) в различных составах во время хранения при 2-8 °С.

[0029] На **Фиг. 16** показан анализ EFX с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

[0030] На **Фиг. 17** показано образование размерных вариантов (ВММ, НММ) в различных составах EFX, хранимых при 25 °С, по данным измерения ОФ-ВЭЖХ. EFX в F18 и F33 демонстрировал наименьшую скорость потери чистоты.

[0031] На **Фиг. 18** показано образование размерных вариантов (ВММ, НММ) в различных составах EFX при 2-8 °С по данным измерения ОФ-ВЭЖХ. EFX в F18 и F33 демонстрировал наименьшую скорость потери чистоты.

[0032] На **Фиг. 19** показана ЭХ-МРЛС-хроматограмма EFX в F18, демонстрирующая основной пик и пики, соответствующие димеру и ВММ молекулам.

[0033] На **Фиг. 20** показан профиль распределения коэффициента седиментации для EFX в F18 и F33 по данным анализа СС-АУЦ.

[0034] На **Фиг. 21** показана кривая ответа концентрации EFX в F18 по данным измерения в клеточном биоанализе активности iLite FGF21. Приведенные данные представляют среднее значение ОЕЛ (относительные единицы люминесценции) для

разведений EFX, посеянных в трех повторах на один планшет. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение по трем значениям ОЕЛ.

[0035] На **Фиг. 22** показана активность EFX по данным клеточного биоанализа в различных составах, хранимых при 25 °С, как функция от времени и в сравнении со стандартом EFX. EFX в F33 демонстрировал наименьшую скорость потери активности.

[0036] На **Фиг. 23** показана активность EFX по данным клеточного биоанализа в различных составах, хранимых при 2-8 °С, как функция от времени и в сравнении со стандартом EFX. EFX в F33 демонстрировал наименьшую скорость потери активности из тестируемых составов.

[0037] На **Фиг. 24** показан FTIR-спектр второй производной EFX в составах F18 и F33.

[0038] На **Фиг. 25** показан КД-спектр в далекой УФ-области EFX в составах F18 и F33.

[0039] На **Фиг. 26** показан КД-спектр в ближней УФ-области EFX в F18 и F33.

[0040] На **Фиг. 27А-27В** показана термограмма мкДСК EFX в F18 (**Фиг. 27А**) и F33 (**Фиг. 27В**) после коррекции базовой линии.

[0041] На **Фиг. 28** показаны термограммы мкДСК EFX в F18 и F33, дважды нагретых до 50 °С.

[0042] На **Фиг. 29** проиллюстрирован пример схемы процесса лиофилизации без отжига (флакон).

[0043] На **Фиг. 30А-30В** проиллюстрирован пример схемы процесса лиофилизации с этапом отжига, проводимым в течение 5 часов при -10 °С (**Фиг. 30А**: флакон), и этапом отжига, проводимым в течение 10 часов при -15 °С (**Фиг. 30В**: двухкамерное устройство).

[0044] На **Фиг. 31** приведены времена восстановления лиофилизованного EFX в выбранных составах.

[0045] На **Фиг. 32** приведены времена восстановления лиофилизованного F33 в флаконах после включения в процесс сухой заморозки этапа отжига (10 часов при -5 °С).

[0046] На **Фиг. 33А-33В** приведены времена восстановления лиофилизованного F33 в двухкамерных устройствах после включения в процесс сухой заморозки этапа отжига (10 часов при -15 °С).

[0047] На **Фиг. 34** приведена удельная площадь поверхности лиофилизованной таблетки, полученной из составов, содержащих такие же компоненты, что и F33, но с разными концентрациями EFX (F1: 50 мг/мл EFX; F2: 28 мг/мл EFX), при сухой заморозке с этапом отжига и без него, по данным измерения методом БЭТ (Брунауэра, Эмметта и Теллера). Лيوфилизованные таблетки получали, используя этап отжига при -5 °С в течение 10 часов или при -10 °С в течение 5 часов, и сравнивали с таблетками, полученными без этапа отжига во время сухой заморозки (схема процесса NA).

[0048] На **Фиг. 35** показаны срезы лиофилизованной таблетки для анализа СЭМ-ЭРС.

[0049] На **Фиг. 36** показаны распределение и медианная площадь поперечного

сечения пор лиофилизированной таблетки по данным СЭМ-ЭРС, представленные в виде графиков размаха.

[0050] На **Фиг. 37** показано улучшение структуры лиофилизированной таблетки по данным СЭМ при включении в цикл сухой заморозки этапа отжига. FR1 и FR2 представляют состав F33 при концентрации белка 50 мг/мл и 28 мг/мл, соответственно.

[0051] На **Фиг. 38** приведена таблица с данными по долгосрочной стабильности лиофилизированного EFX при 25 °С в составах F15, F16, F17 и F33.

[0052] На **Фиг. 39** приведен линейчатый график, иллюстрирующий персистенцию EFX, вводимого в различных составах крысам, как описано в примере 7. Концентрация (нг/мл) указана по оси у, тогда как время (часы) указано по оси х.

[0053] На **Фиг. 40** приведена таблица, в которой обобщены фармакокинетические параметры, отражающие общее системное воздействие (ППК) и наибольшую концентрацию в системной циркуляции (Смакс) EFX, вводимого в различных составах, описанных в примерах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0054] EFX представляет собой вариант FGF21, слитый с Fc-доменом. Что удивительно, EFX обладает уникальными свойствами, которые усложняют составление и хранение белка. Исходные инъекционные биопрепараты часто составляют при слабокислом или нейтральном pH (например, от pH 5,2 до pH 6,9), чтобы минимизировать посттрансляционные модификации, такие как дезамидирование. Неожиданно EFX резко меняет свои вязкоупругие свойства при pH ниже 6,5, проявляя гелеподобное поведение, разделение фаз и потерю текучести. Эти особенности затрудняют подкожное введение продукта и разработку инъекционных биопрепаратов. Кроме того, при pH 6,9 или ниже композиции EFX демонстрировали подверженность агрегации и усечению/фрагментации белков, а также образованию видимых и невидимых невооруженным глазом частиц. Эти изменения также нежелательны для инъекционных биопрепаратов, поскольку они могут быть связаны с проблемами безопасности (в частности, иммуногенностью) и стабильности. Материалы и способы, описанные в данном документе, обеспечивают значительное техническое преимущество за счет обеспечения составов EFX, которые подходят для инъекций и являются стабильными при хранении, например, в виде жидкости в условиях охлаждения (2-8 °С) и в виде лиофила в условиях охлаждения и окружающей среды (25 °С). В различных аспектах изобретения описанный в данном документе состав обеспечивает повышенную конформационную стабильность EFX (например, за счет предотвращения фазового разделения, образования жесткого геля, неньютоновского вязкоупругого поведения и агрегации и/или образования частиц), снижает посттрансляционные модификации (например, зарядовые и/или размерные варианты) и придает композициям EFX благоприятные свойства в растворах.

[0055] *Определения*

[0056] Терминология, используемая в данном документе для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевает ограничения.

[0057] «АО-ВЭЖХ» относится к анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0058] «АСГ» относится к алкогольному стеатогепатиту.

[0059] «АБП» относится к алкогольной болезни печени.

[0060] «АЖБП» относится к алкогольной жировой болезни печени.

[0061] «БЭТ» относится к методу Брунауэра, Эмметта и Теллера.

[0062] «КЭ-ДСН» относится к капиллярному электрофорезу с додецил-сульфатом натрия.

[0063] «ЕФХ» относится к эфруксифермину.

[0064] «ВММ» относится к соединениям с высокой молекулярной массой.

[0065] «КИЭФв» относится к капиллярному изоэлектрическому фокусированию с визуализацией.

[0066] «НММ» относится к соединениям с низкой молекулярной массой.

[0067] «НАЖБП» относится к неалкогольной жировой болезни печени.

[0068] «НАСГ» относится к неалкогольному стеатогепатиту.

[0069] «ОВ» относится к относительной влажности.

[0070] «ОФ-ВЭЖХ» относится к обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0071] «ЭХ-ВЭЖХ» относится к эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0072] «СЭМ-ЭДР» относится к сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией.

[0073] «СС-АУЦ» относится к методу определения скорости седиментации и аналитическому ультрацентрифугированию.

[0074] «рI» относится к изоэлектрической точке.

[0075] В изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая эфруксифермин. В различных аспектах композиция содержит ЕФХ, сахар, аргинин-НСI или аргинин/глутаминовую кислоту (например, в концентрации около 20-200 мМ) и поверхностно-активное вещество. Композиция имеет рН от около 6,9 до около 8,1. В альтернативных аспектах композиция содержит ЕФХ, L-лизин, поверхностно-активное вещество (например, полисорбат-20) и Трис при рН около $7,8 \pm 0,3$. Также предложен способ получения лиофилизированной композиции, содержащей ЕФХ. В изобретении также предложены способы применения описанных в данном документе фармацевтических композиций для лечения ряда нарушений, таких как (но не ограничиваясь этим) неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), алкогольный стеатогепатит (АСГ), алкогольная болезнь печени (АБП) или алкогольная жировая болезнь печени (АЖБП), диабет 2 типа, ожирение, гипертриглицеридемия, дислипидемия, заболевания, вызываемые неправильным сворачиванием белка, пристрастия или зависимости, а также уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с

НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, нормализации содержания жира в печени, снижения уровня глюкозы в крови, повышения чувствительности к инсулину и/или снижения уровней мочевой кислоты. Различные аспекты композиций и способов более подробно описаны ниже. Использование подзаголовков предназначено только для удобства читателя, и его не следует воспринимать как ограничение изобретения каким-либо образом. Весь документ следует рассматривать как единое раскрытие, при этом предусмотрены все комбинации признаков, описанных ниже.

[0076] EFX представляет собой 92,1 кДа аналог фактора роста фибробластов 21 (FGF21) длительного действия, получаемый путем слияния Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина IgG1 через поли(глицин-сериновый) линкер с вариантом человеческого FGF21. Каждая молекула содержит один димерный Fc-домен и две модифицированные полипептидные цепи FGF21. EFX имеет 8 дисульфидных связей, 6 внутрицепочечных и 2 межцепочечных, как изображено на Фиг. 1. Две их внутрицепочечных дисульфидных связей находятся в полипептиде FGF21 между Cys318 и Cys336, по одной на каждый мономер. В последовательность FGF21 были внесены три модификации в L341R, P414G и A423E (что соответствует L98R, P171G и A180E в зрелом человеческом FGF21). Эти модификации 1) снижают восприимчивость к *in vivo* протеолитической деградации, 2) повышают аффинность к β -Klotho и 3) снижают подверженность агрегации (Hecht et al., PLoS One 2012; 7(11): e49345; Stanislaus et al., Endocrinology. 2017;158(5):1314-1327).

[0077] EFX содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. EFX был дополнительно описан в патентах США №№ 8034770; 8410051; 8642546; 8361963; 9273106; 10011642; 8188040; 8835385; 8795985; 8618053; и 11072640; или международных патентных публикациях №№ WO2009149171 и WO2010129503, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[0078] EFX может присутствовать в фармацевтической композиции в любом подходящем количестве. В различных аспектах концентрация EFX в фармацевтической композиции составляет от около 25 мг/мл до около 150 мг/мл. Например, концентрация EFX в фармацевтической композиции составляет по меньшей мере около 25 мг/мл, по меньшей мере около 30 мг/мл, по меньшей мере около 35 мг/мл, по меньшей мере около 40 мг/мл, по меньшей мере около 45 мг/мл, по меньшей мере около 50 мг/мл или по меньшей мере около 70 мг/мл, и не более чем около 150 мг/мл, не более чем около 140 мг/мл, не более чем около 130 мг/мл, не более чем около 120 мг/мл, не более чем около 110 мг/мл или не более чем около 100 мг/мл. В типовых аспектах композиция содержит EFX в концентрации около 28 мг/мл. В типовых аспектах композиция содержит EFX в концентрации около 50 мг/мл. В типовых аспектах композиция содержит EFX в концентрации около 70 мг/мл. В типовых аспектах композиция содержит EFX в концентрации около 100 мг/мл.

[0079] Фармацевтическая композиция, содержащая EFX, может представлять собой жидкий, лиофилизированный или гелевый состав.

[0080] Описанные в данном документе фармацевтические композиции содержат сахар. Подходящие сахара включают, но не ограничиваются этим, сахарозу, фруктозу, мальтозу, глюкозу, галактозу, лактозу, сорбит, маннит или их комбинацию. Сахар может присутствовать в композиции в концентрации от около 10 мМ до около 250 мМ, или от около 20 мМ до около 220 мМ, или от около 50 мМ до около 220 мМ, или от около 80 до около 220 мМ, или около 120 мМ. В некоторых аспектах концентрация сахара в фармацевтической композиции составляет по меньшей мере около 10 мМ, по меньшей мере около 20 мМ, по меньшей мере около 30 мМ, по меньшей мере около 40 мМ, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, по меньшей мере около 80 мМ, по меньшей мере около 90 мМ, по меньшей мере около 100 мМ, по меньшей мере около 110 мМ или по меньшей мере около 120 мМ, и не более чем около 250 мМ, не более чем около 240 мМ, не более чем около 230 мМ, не более чем около 220 мМ, не более чем около 210 мМ, не более чем около 200 мМ, не более чем около 190 мМ, не более чем около 180 мМ, не более чем около 170 мМ, не более чем около 160 мМ, не более чем около 150 мМ, не более чем около 140 мМ или не более чем около 130 мМ.

[0081] Необязательно, описанные в данном документе фармацевтические композиции содержат сахар в концентрации около 50 мМ, около 80 мМ, около 100 мМ, около 110 мМ, около 115 мМ, около 120 мМ или около 125 мМ, около 130 мМ, около 135 мМ, около 140 мМ, около 145 мМ, около 150 мМ, около 155 мМ, около 160 мМ, около 165 мМ, около 175 мМ, около 180 мМ, около 185 мМ, около 190 мМ, около 210 мМ, около 215 мМ, около 220 мМ, около 225 мМ, около 230 мМ или около 235 мМ.

[0082] В различных аспектах фармацевтическая композиция находится в жидкой или лиофилизированной форме. Типовая жидкая или лиофилизированная фармацевтическая композиция (например, лиофилизированная форма любого из описанных в данном документе жидких составов, полученная посредством сухой заморозки) содержит сахарозу в концентрации от около 50 мМ до около 220 мМ, например, около 80 мМ или около 120 мМ.

[0083] В различных аспектах сахар представляет собой трегалозу. Например, в некоторых аспектах фармацевтическая композиция представляет собой гелевый состав, а сахар представляет собой трегалозу. Типовой гелевый состав содержит трегалозу в концентрации от около 180 мМ до около 250 мМ, например, 220 мМ.

[0084] В различных аспектах фармацевтический состав содержит аминокислоту, такую как аргинин, аргинин/аргинин-НСl, аргинин/глутаминовая кислота, глицин, глутамин, аспарагин или лизин. В различных аспектах композиция содержит аргинин/аргинин-НСl. В различных аспектах аргинин/аргинин-НСl присутствует в соотношении от около 1:10 аргинина/аргинина-НСl до около 1:100 аргинина/аргинина-НСl. В некоторых аспектах аргинин/аргинин-НСl находится в соотношении от около 1:30 аргинина/аргинина-НСl до около 1:50 аргинина/аргинина-НСl. В различных аспектах аргинин/аргинин-НСl присутствует в соотношении около 1:10 аргинина/аргинина-НСl,

около 1:20 аргинина/аргинина-НСl, около 1:30 аргинина/аргинина-НСl, около 1:40 аргинина/аргинина-НСl, около 1:50 аргинина/аргинина-НСl, около 1:60 аргинина/аргинина-НСl, около 1:70 аргинина/аргинина-НСl, около 1:80 аргинина/аргинина-НСl, около 1:90 аргинина/аргинина-НСl или около 1:100 аргинина/аргинина-НСl. В различных аспектах композиция содержит от около 20 мМ до около 200 мМ аргинина/аргинина-НСl. В некоторых аспектах концентрация аргинина/аргинина-НСl в фармацевтической композиции составляет, в различных аспектах, по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, по меньшей мере около 75 мМ, по меньшей мере около 80 мМ, по меньшей мере около 85 мМ, по меньшей мере около 90 мМ, по меньшей мере около 95 мМ или по меньшей мере около 100 мМ, и не более чем около 200 мМ, не более чем около 180 мМ, не более чем около 175 мМ, не более чем около 160 мМ, не более чем около 155 мМ, не более чем около 150 мМ, не более чем около 145 мМ, не более чем около 140 мМ, не более чем около 135 мМ, не более чем около 130 мМ, не более чем около 125 мМ, не более чем около 120 мМ, не более чем около 110 мМ, не более чем около 100 мМ, не более чем около 90 мМ, не более чем около 80 мМ, не более чем около 70 мМ или не более чем около 60 мМ. В репрезентативном аспекте изобретения композиция содержит около 120 мМ аргинина/аргинина-НСl. В другом репрезентативном аспекте изобретения композиция содержит около 80 мМ аргинина/аргинина-НСl. В различных аспектах фармацевтическая композиция находится в гелевой форме. Типовая гелевая фармацевтическая композиция не содержит одну или более аминокислот (т. е. не содержит аминокислоту, такую как аргинин, аргинин/аргинин-НСl, аргинин/глутаминовая кислота, глицин, глутамин, аспарагин или лизин).

[0085] В различных аспектах композиция содержит аргинин/глутаминовую кислоту или аргинин/глутамат. В контексте данного документа термины «глутаминовая кислота» и «глутамат» можно использовать взаимозаменяемо. В различных аспектах аргинин/глутаминовая кислота присутствует в соотношении от около 1:10 аргинина/глутаминовой кислоты до около 1:100 аргинина/глутаминовой кислоты. В различных аспектах аргинин/глутаминовая кислота присутствует в соотношении около 1:10 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:20 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:30 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:40 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:50 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:60 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:70 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:80 аргинина/глутаминовой кислоты, около 1:90 аргинина/глутаминовой кислоты или около 1:100 аргинина/глутаминовой кислоты. В некоторых аспектах аргинин/глутаминовая кислота присутствует в соотношении от около 1:30 аргинина/глутаминовой кислоты до около 1:50 аргинина/глутаминовой кислоты.

[0086] В различных аспектах композиция содержит от около 20 мМ до около 200 мМ аргинина/глутаминовой кислоты. Например, общая концентрация аргинина/глутаминовой кислоты в фармацевтической композиции необязательно

составляет по меньшей мере около 20 мМ, по меньшей мере около 30 мМ, по меньшей мере около 35 мМ, по меньшей мере около 40 мМ, по меньшей мере около 45 мМ или по меньшей мере около 50 мМ, по меньшей мере около 55 мМ, по меньшей мере около 60 мМ, по меньшей мере около 65 мМ, по меньшей мере около 70 мМ, по меньшей мере около 75 мМ, по меньшей мере около 80 мМ, по меньшей мере около 85 мМ, по меньшей мере около 90 мМ, по меньшей мере около 95 мМ или по меньшей мере около 100 мМ, и не более чем около 200 мМ, не более чем около 180 мМ, не более чем около 175 мМ, не более чем около 170 мМ, не более чем около 165 мМ, не более чем около 160 мМ, не более чем около 155 мМ, не более чем около 150 мМ, не более чем около 145 мМ, не более чем около 140 мМ, не более чем около 135 мМ, не более чем около 130 мМ, не более чем около 125 мМ, не более чем около 120 мМ, не более чем около 115 мМ, не более чем около 110 мМ, не более чем около 105 мМ, не более чем около 100 мМ, не более чем около 90 мМ, не более чем около 80 мМ, не более чем около 70 мМ или не более чем около 60 мМ. В типовых аспектах композиция содержит аргинин/глутаминовую кислоту в общей концентрации в диапазоне 80-150 мМ или 90-150 мМ, например, около 80 мМ или около 120 мМ.

[0087] В различных аспектах аминокислота представляет собой лизин (например, L-лизин или L-лизин-НСl). Любое описание в данном документе, относящееся к L-лизину, также применимо к лизину-НСl. В различных аспектах композиция содержит около 0,1%-10% лизина. Например, концентрация лизина в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5% или по меньшей мере около 2%, и не более чем около 10%, не более чем около 9%, не более чем около 8%, не более чем около 7%, не более чем около 6%, не более чем около 4% или не более чем около 3%. В типовых аспектах композиция содержит лизин в концентрации около 2,9%. В различных аспектах композиция содержит около 6,8 мМ - 684,0 мМ L-лизина. Например, концентрация L-лизина в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 6,8 мМ, по меньшей мере около 34,2 мМ, по меньшей мере около 68,4 мМ, по меньшей мере около 102,6 мМ или по меньшей мере около 136,8 мМ, и не более чем около 684,0 мМ, не более чем около 615,6 мМ, не более чем около 547,2 мМ, не более чем около 478,8 мМ, не более чем около 410,4 мМ, не более чем около 273,6 мМ или не более чем около 205,2 мМ. В типовых аспектах композиция содержит L-лизин в концентрации около 198,3 мМ. В различных аспектах композиция содержит около 5,5 мМ - 547,5 мМ лизина-НСl. Например, концентрация лизина-НСl в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 5,5 мМ, по меньшей мере около 27,4 мМ, по меньшей мере около 54,8 мМ, по меньшей мере около 82,1 мМ или по меньшей мере около 109,5 мМ, и не более чем около 547,5 мМ, не более чем около 492,7 мМ, не более чем около 438,0 мМ, не более чем около 383,2 мМ, не более чем около 328,5 мМ, не более чем около 218,0 мМ или не более чем около 164,2 мМ. В типовых аспектах композиция содержит лизин-НСl в концентрации около 158,8 мМ.

[0088] В различных аспектах композиция содержит щелочной буферный агент, такой как Трис (триметамин) и/или Трис-НСl. В контексте данного документа термины «Трис» и «триметамин» можно использовать взаимозаменяемо. В различных аспектах композиция содержит около 1-50 мМ Трис. Например, концентрация Трис в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 1 мМ, по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, и не более чем около 15 мМ, не более чем около 20 мМ, не более чем около 25 мМ, не более чем около 30 мМ, не более чем около 35 мМ, не более чем около 40 мМ, не более чем около 45 мМ или не более чем около 50 мМ. В типовых аспектах композиция содержит Трис в концентрации около 10 мМ. В различных аспектах композиция содержит около 1-50 мМ Трис-НСl. Например, концентрация Трис-НСl в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 1 мМ, по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, и не более чем около 15 мМ, не более чем около 20 мМ, не более чем около 25 мМ, не более чем около 30 мМ, не более чем около 35 мМ, не более чем около 40 мМ, не более чем около 45 мМ или не более чем около 50 мМ. В типовых аспектах композиция содержит Трис-НСl в концентрации около 10 мМ. В различных аспектах композиция содержит как около 1-50 мМ Трис, так и 1-50 мМ Трис-НСl.

[0089] Описанная в данном документе фармацевтическая композиция содержит, в различных аспектах, поверхностно-активное вещество. Необязательно, поверхностно-активное вещество представляет собой неионное поверхностно-активное вещество. Типовые поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются этим, полисорбат 20 (PS20), полисорбат 40 (PS40), полисорбат 60 (PS60), полисорбат 80 (PS80), полоксамер 188, полоксамер 407, полиоксиэтилен или их комбинацию. В различных аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60 или полисорбат 80. В типовом аспекте поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80. В другом типовом аспекте поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

[0090] В различных вариантах осуществления состав дополнительно содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ) любой молекулярной массы, такой как ПЭГ 3350, ПЭГ 4000, ПЭГ 6000 или ПЭГ1000 (например, ПЭГ 3350 или ПЭГ 4000). Например, в различных аспектах состав содержит от около 0,05% до около 5% ПЭГ (например, ПЭГ 4000), необязательно от около 0,15% до около 1,5% ПЭГ (например, ПЭГ 4000), например, от около 0,1% до около 1% ПЭГ (например, ПЭГ 4000) или около 0,5% ПЭГ (например, ПЭГ 4000). В альтернативном случае, в различных вариантах осуществления состав содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) или карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) или их соли, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза натрия (Na-ГПМЦ) или карбоксиметилцеллюлоза натрия (Na-КМЦ). В связи с этим состав необязательно содержит от около 0,05% до около 5% КМЦ или ГПМЦ (или ее соли), необязательно от около 0,15% до около 1,5% ГПМЦ (например, Na-ГПМЦ) или КМЦ (например, Na-КМЦ), например, от около 0,1% до около 1% ГПМЦ (например, Na-ГПМЦ) или КМЦ (например,

Na-КМЦ) или около 0,5% ГПМЦ (например, Na-ГПМЦ) или КМЦ (например, Na-КМЦ). В различных аспектах состав содержит смесь ПЭГ и КМЦ (или ее соли) или ГПМЦ (или ее соли), при этом эти компоненты присутствуют в любых количествах, описанных в данном документе. Необязательно, состав содержит ПЭГ, ГПМЦ (или ее соль) и КМЦ (или ее соль).

[0091] Описанная в данном документе фармацевтическая композиция может содержать одно поверхностно-активное вещество или несколько поверхностно-активных веществ в разных соотношениях. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество включено в концентрации от около 0,001% до около 1% масс./об. (или от около 0,002% до около 0,5%). В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации по меньшей мере около 0,001%, по меньшей мере около 0,002%, по меньшей мере около 0,003%, по меньшей мере около 0,004%, по меньшей мере около 0,005%, по меньшей мере около 0,007%, по меньшей мере около 0,01% или по меньшей мере около 0,05%, и не более чем около 0,1%, не более чем около 0,2%, не более чем около 0,3%, не более чем около 0,4%, не более чем около 0,5%, не более чем около 0,6%, не более чем около 0,7%, не более чем около 0,8%, не более чем около 0,9% или не более чем около 1,0% масс./об. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации около 0,001%, около 0,002%, около 0,003%, около 0,004%, около 0,005%, около 0,006%, около 0,007%, около 0,008%, около 0,009%, около 0,01%, около 0,05%, около 0,1%, около 0,2%, около 0,3%, около 0,4%, около 0,5%, около 0,6%, около 0,7%, около 0,8%, около 0,9% или около 1% масс./об. В типовом аспекте композиция содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от около 0,004% до около 0,1% масс./об. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит полисорбат 20 или полисорбат 80, необязательно в концентрации от около 0,004% до около 0,1% масс./об. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, при этом полисорбат 20 присутствует в концентрации около 0,06% масс./об. В альтернативном варианте полисорбат 20 присутствует в концентрации около 0,008% (масс./об.).

[0092] В различных аспектах композиция также может содержать буферный агент. Подходящие буферы включают, но не ограничиваются этим, буфер Трис-НСI, буфер на основе глутамата натрия/глутаминовой кислоты, буфер на основе глицилглицина/глицилглицина-НСI, гистидиновый буфер или цитратный буфер (или их комбинацию). В различных аспектах композиция содержит от около 5 мМ до около 200 мМ буфера. Например, концентрация буфера Трис-НСI в фармацевтической композиции необязательно составляет по меньшей мере около 5 мМ, по меньшей мере около 10 мМ, по меньшей мере около 15 мМ, по меньшей мере около 20 мМ, по меньшей мере около 25 мМ или по меньшей мере около 30 мМ, и не более чем около 200 мМ, не более чем около 180 мМ, не более чем около 160 мМ, не более чем около 140 мМ, не более чем около 120 мМ, не более чем около 100 мМ, не более чем около 80 мМ, не более чем около 60 мМ или

не более чем около 50 мМ. В различных аспектах буфер представляет собой буфер Трис-НСl, который необязательно включен в концентрации от около 10 мМ до около 50 мМ. В репрезентативном аспекте изобретения композиция содержит около 20 мМ буфера Трис-НСl. В случае фармацевтической композиции, которая представляет собой гелевый состав, в различных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать натрий-фосфатный буфер, буфер на основе сукцината натрия/янтарной кислоты или буфер на основе ацетата натрия/уксусной кислоты.

[0093] Необязательно, рН фармацевтической композиции составляет от около 6 до около 8,1. В различных аспектах рН фармацевтической композиции составляет от около 6,9 до около 8,1. В различных аспектах рН фармацевтической композиции составляет от около 7 до около 8, например, от около 7,0 до около 7,8, или от около 7,2 до около 7,4, или от около 7,5 до около 8. В некоторых аспектах рН фармацевтической композиции составляет около 7,3 (например, $7,3 \pm 0,3$). В некоторых аспектах рН фармацевтической композиции составляет около 7,8 (например, $7,8 \pm 0,3$).

[0094] Стабильность белковой композиции характеризуют путем исследования одного или более свойств фармацевтической композиции, которое можно проводить в любой необходимый момент времени после составления, включая моменты времени хранения композиции при любой из ряда температур или при любых из ряда условий. Стабильные композиции в контексте изобретения в общем случае демонстрируют, например, минимальное или сниженное разделение фаз, минимальное или сниженное образование геля с жесткой консистенцией, ньютоновское вязкоупругое поведение, минимальное или сниженное количество продуктов деградации EFX и/или минимальное или сниженное количество посттрансляционных модификаций EFX (например, минимальное или сниженное количество зарядовых и/или размерных вариантов). Необязательно, фармацевтическая композиция проявляет одно или более из этих свойств при хранении в виде жидкости в условиях охлаждения (2-8 °C) (необязательно при хранении в течение 21 месяца) и в виде лиофила при более стрессовых условиях окружающей среды (25 °C).

[0095] В фармацевтической композиции, описанной в данном документе, минимизировано количество нежелательных видов зарядовых и размерных вариантов EFX, что обеспечивает значительное техническое преимущество для производства, хранения, распространения и самостоятельного приема продукта пациентами в домашних условиях. Зарядовые варианты представляют собой формы EFX с разным распределением заряда (т. е. более кислотные или основные варианты EFX), которые могут образовываться в результате посттрансляционных модификаций. В различных аспектах композиция содержит не более чем около 40% видов зарядовых вариантов при хранении в диапазоне температур от -30 °C до -20 °C в течение до 24 месяцев. Измерение зарядовых вариантов EFX можно проводить, используя любое число методик, например, АО-ВЭЖХ и КИЭФв. При использовании АО-ВЭЖХ зарядовые варианты EFX характеризуют по процентному содержанию пре-пиков на хроматограммах (основные варианты или

зарядовые варианты EFX с меньшим отрицательным зарядом на поверхности), основного пика и пост-пиков (кислотные варианты или зарядовые варианты EFX с большим отрицательным зарядом на поверхности). АО-ВЭЖХ дополнительно описана в примере 3. В альтернативном варианте разрешение зарядовых вариантов EFX можно проводить, используя кИЭФв, на основании изоэлектрической точки (pI) EFX или зарядовых вариантов и измерять процентное содержание пре-пиков *кислотные варианты), основного пика и пост-пиков (основные пики) на электроферограммах кИЭФв. Материалы и способы, относящиеся к кИЭФв, дополнительно описаны в примере 3. В различных аспектах композиция представляет собой жидкую композицию и содержит не более чем около 40%, не более чем около 35%, не более чем около 30%, не более чем около 25%, не более чем около 20%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% зарядовых вариантов, необязательно при хранении в диапазоне температур от -30 °С до -20 °С в течение до 24 месяцев (т. е. жидкая композиция содержит не более этого уровня зарядовых вариантов при тестировании между 0 и 24 месяцами в условиях хранения, включающих температуру от -30 °С до -20 °С). В типовых аспектах жидкая композиция содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов при хранении в диапазоне температур от -30 °С до -20 °С в течение до 24 месяцев.

[0096] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию и предпочтительно содержит не более чем около 40%, не более чем около 35%, не более чем около 30%, не более чем около 25%, не более чем около 20%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% зарядовых вариантов при хранении в диапазоне температур от 2 °С до 8 °С в течение до 9 месяцев (т. е. жидкая или лиофилизированная композиция содержит не более этого уровня зарядовых вариантов при тестировании между 0 и 9 месяцами в условиях хранения, включающих температуру от 2 °С до 8 °С). В типовых аспектах жидкая или лиофилизированная композиция содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов при хранении при около 2-8 °С в течение до 9 месяцев.

[0097] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию и содержит не более чем около 40%, не более чем около 35%, не более чем около 30%, не более чем около 25%, не более чем около 20%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% зарядовых вариантов при хранении при около 20-30 °С в течение до 4 недель (т. е. жидкая или лиофилизированная композиция содержит не более этого уровня зарядовых вариантов при тестировании между 0 и 4 неделями в условиях хранения, включающих температуру около 20-30 °С/относительную влажность 60%). В типовых аспектах жидкая или лиофилизированная композиция содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов при хранении при около 25 °С в течение до 4 недель.

[0098] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированную композицию и содержит не более чем около 40%, не более чем около 35%, не более чем около 30%, не более чем около 25%, не более чем около 20%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% зарядовых вариантов при хранении при около 20-30 °С в течение до 14 месяцев (т. е. лиофилизированная композиция содержит не более этого уровня зарядовых вариантов при тестировании между 0 и 14 месяцами в условиях хранения, включающих температуру около 20-30 °С/относительную влажность 60%). В типовых аспектах лиофилизированная композиция содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов при хранении при около 25 °С в течение до 14 месяцев.

[0099] Зарядовые варианты в контексте изобретения относятся к агрегации или образованию высокомолекулярных видов (ВММ) и фрагментации или образованию низкомолекулярных видов (НММ) EFX. Измерение размерных вариантов EFX можно проводить, используя любую из ряда методик, например, с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ), капиллярного электрофореза с додецил-сульфатом натрия (КЭ-ДСН, в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) или обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ-ВЭЖХ), аналитического ультрацентрифугирования с определением скорости седиментации (СС-АУЦ) и гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия (ДСН-ПААГ).

[00100] Используя ЭХ-ВЭЖХ, размерные варианты EFX характеризуют по выявлению гомодимера EFX в качестве основного вида, преобладающего хроматографического пика, и низких уровней димера (состоящего из двух гомодимеров EFX) и высокомолекулярных (ВММ) размерных вариантов EFX в профиле ВЭЖХ. Материалы и способы, относящиеся к ЭХ-ВЭЖХ, дополнительно описаны в примере 3.

[00101] Используя КЭ-ДСН и денатурирующих условиях, размерные варианты EFX характеризуют по сдвигу пиков на электроферограмме по данным УФ-поглощения на 220 нм. При использовании этого анализа невосстановленный денатурированный EFX демонстрирует интактный белок как основной пик, тогда как одноцепочечные и низкомолекулярные виды находятся до основного пика как пре-пики, а агрегаты/ВММ размерные варианты находятся после основного пика как пост-пики. Материалы и способы, относящиеся к КЭ-ДСН, дополнительно описаны в примере 3.

[00102] Используя ОФ-ВЭЖХ, размерные варианты EFX характеризуют по выявлению пиков элюированного белка EFX с помощью детектора УФ-поглощения на 280 нм. При использовании этого анализа размерные варианты видно как пре- или пост-пики, отделенные от основного пика на хроматограмме. Материалы и способы, относящиеся к ОФ-ВЭЖХ, дополнительно описаны в примере 3.

[00103] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию и предпочтительно содержит не более чем

около 10%, не более чем около 9%, не более чем около 8%, не более чем около 7%, не более чем около 6%, не более чем около 5%, не более чем около 4%, не более чем около 3%, не более чем около 2%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% размерных вариантов EFX при хранении при температуре около 20-30 °С, например, около 25 °С, в течение до 20 недель (т. е. жидкая композиция содержит не более этого уровня видов размерных вариантов при тестировании между 0 и 20 неделями в условиях хранения при этой температуре). В типовых аспектах жидкая композиция содержит не более чем около 10% видов размерных вариантов EFX при хранении при около 25 °С в течение до 20 недель. В типовых аспектах лиофилизированная композиция содержит около 0% видов размерных вариантов EFX (т. е. виды размерных вариантов EFX не выявляются) при хранении при около 25 °С в течение до 20 недель.

[00104] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию и предпочтительно содержит не более чем около 10%, не более чем около 9%, не более чем около 8%, не более чем около 7%, не более чем около 6%, не более чем около 5%, не более чем около 4%, не более чем около 3%, не более чем около 2%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% размерных вариантов EFX при хранении при температуре около 2-8 °С в течение до 14 месяцев (т. е. жидкая композиция содержит не более этого уровня видов размерных вариантов при тестировании между 0 и 14 месяцами в условиях хранения, включающих температуру около 2-8 °С). В типовых аспектах жидкая композиция содержит не более чем около 10% видов размерных вариантов EFX при хранении при около 2-8 °С в течение до 14 месяцев. В типовых аспектах лиофилизированная композиция содержит около 0% видов размерных вариантов EFX (т. е. виды размерных вариантов EFX не выявляются) при хранении при около 2-8 °С в течение до 14 месяцев.

[00105] В различных аспектах фармацевтическая композиция представляет собой жидкую или лиофилизированную композицию и предпочтительно содержит не более чем около 20%, не более чем около 15%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 4%, не более чем около 3%, не более чем около 2%, не более чем около 1%, не более чем около 0,1% или не более чем около 0,01% размерных вариантов EFX при хранении при температуре около 20-30 °С (например, около 25 °С) в течение до 4 недель (т. е. жидкая композиция содержит не более этого уровня видов размерных вариантов при тестировании между 0 и 4 неделями в условиях хранения, включающих температуру около 25 °С). В типовых аспектах жидкая композиция содержит не более чем около 20% видов зарядовых вариантов EFX при хранении при около 25 °С в течение до 4 недель. В типовых аспектах лиофилизированная композиция содержит около 0% видов размерных вариантов EFX (т. е. виды размерных вариантов EFX не выявляются) при хранении при около 25 °С в течение до 14 месяцев.

[00106] В различных аспектах изобретения фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированную композицию. При лиофилизации остаточное содержание влаги лиофилизованного продукта необязательно составляет 1% или менее

(например, около 0,5% или менее). В различных аспектах лиофилизированный состав восстанавливают соответствующим разбавителем для образования восстановленной композиции лиофилизированного EFX, предусмотренной изобретением. В связи с этим в изобретении также предложены способы восстановления описанных в данном документе фармацевтических композиций. Способ включает (а) восстановление лиофилизированной фармацевтической композиции, описанной в данном документе, в течение около пяти минут и (b) введение восстановленной композиции субъекту. Необязательно, этап (b) включает подкожное введение восстановленной композиции субъекту. В изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, которая представляет собой восстановленную композицию, полученную из лиофилизированного состава по изобретению, смешанного с разбавителем.

[00107] В связи с этим в изобретении дополнительно предложен способ получения лиофилизированной композиции. Способ включает следующие этапы: (а) заморозка фармацевтической композиции, описанной в данном документе; (b) отжиг фармацевтической композиции этапа (а) при температуре от около -5°C до около -15°C ; (с) первичная сушка продукта этапа (b) и d) вторичная сушка продукта этапа (с). Примечательно, что описанный в данном документе способ позволяет получить лиофилизированный лекарственный продукт EFX с улучшенными свойствами. Например, продукт, полученный в результате способа лиофилизации, можно восстанавливать за удивительно короткое время (от менее 1 минуты до 10 минут) по сравнению с продуктом, полученным при других условиях лиофилизации. Во многих случаях время восстановления улучшается приблизительно на 50% или более по сравнению с другими фармацевтическими композициями и способами лиофилизации. Кроме этого, способ получения лиофилизированной композиции, описанный в данном документе, значительно уменьшает удельную площадь поверхности (менее плотные таблетки) получаемой таблетки, что связано со значительно меньшим временем восстановления. Это обеспечивает значительное преимущество для врачей и пациентов, так как восстановление можно проводить незадолго до введения, что минимизирует время для подготовки дозы в месте оказания медицинской помощи или перед самостоятельным приемом.

[00108] В различных аспектах заморозку на этапе (а) способа лиофилизации проводят при температуре от около -40°C до около -50°C . В различных аспектах заморозку на этапе (а) проводят при температуре около -40°C , около -41°C , около -42°C , около -43°C , около -44°C , около -45°C , около -46°C , около -47°C , около -48°C , около -49°C или около -50°C .

[00109] В различных аспектах отжиг на этапе (b) проводят в течение от около 5 часов до около 20 часов. В различных аспектах отжиг на этапе (b) проводят в течение около 5 часов, около 6 часов, около 7 часов, около 8 часов, около 9 часов или около 10 часов.

[00110] В различных аспектах отжиг на этапе (b) проводят при температуре от около -5°C до около -20°C . В различных аспектах отжиг на этапе (b) проводят при

температуре около -5°C , около -6°C , около -7°C , около -8°C , около -9°C , около -10°C , около -11°C , около -12°C , около -13°C , около -14°C , около -15°C , около -16°C , около -17°C , около -18°C , около -19°C или около -20°C .

[00111] В различных аспектах первичную сушку на этапе (с) проводят при давлении в камере от около 0,08 до 0,2 мбар. В различных аспектах первичную сушку на этапе (с) проводят при давлении в камере около 0,08, около 0,09, около 0,10, около 0,11, около 0,12, около 0,13, около 0,14, около 0,15, около 0,16, около 0,17, около 0,18, около 0,19 или около 0,20 мбар.

[00112] В различных аспектах первичную сушку на этапе (с) проводят при температуре от около -5°C до -30°C . В различных аспектах первичную сушку на этапе (с) проводят при температуре около -10°C , около -11°C , около -12°C , около -13°C , около -14°C , около -15°C , около -16°C , около -17°C , около -18°C , около -19°C , около -20°C , около -21°C , около -22°C , около -23°C , около -24°C , около -25°C , около -26°C , около -27°C , около -28°C , около -29°C или около -30°C .

[00113] В различных аспектах вторичную сушку на этапе (с) проводят при температуре от около 35 до 55°C . В различных аспектах вторичную сушку на этапе (с) проводят при температуре около 35°C , около 40°C , около 45°C , около 50°C или около 55°C .

[00114] Описанную в данном документе фармацевтическую композицию EFX можно применять для лечения, облегчения, предотвращения или реверсии ряда заболеваний, нарушений или состояний, включая, но не ограничиваясь этим, метаболические нарушения. В различных аспектах в изобретении предложен способ лечения заболевания или нарушения, при этом способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту (например, человеку) фармацевтической композиции, содержащей EFX. Заболевание или нарушение может представлять собой любое из следующего: неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), стеатоз печени, алкогольный стеатогепатит (АСГ), алкогольная болезнь печени (АБП) или алкогольная жировая болезнь печени (АЖБП), диабет (например, диабет 2 типа), ожирение, пристрастия или зависимости (связанные с алкоголем или другие, например, пищевые), гипертриглицеридемия, дислипидемия, сердечно-сосудистое заболевание (такое как атеросклероз) или старение. В различных аспектах в изобретении предложен способ реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка. В связи с этим после лечения оценка фиброза у субъекта на основании гистологической системы оценки НАСГ Сети центров клинических исследований (CRN) (Kleiner D et al, 2005 Hepatology 41, 1313) предпочтительно снижается от F4 (цирроз) до F3 (распространенный фиброз) или менее. В типовых вариантах осуществления зависимость включает постоянную, навязчивую зависимость от поведения или вещества, такого как алкоголь, наркотики или никотин. В типовых вариантах осуществления пристрастие включает сильную, настойчивую или аномальную необходимость в определенном веществе или

виде активности, например, сахаре. В изобретении также предложен способ нормализации содержания жира в печени, снижения уровней глюкозы в крови, повышения чувствительности к инсулину и/или снижения уровней мочевой кислоты путем введения нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции EFX, описанной в данном документе. В типовых вариантах осуществления нормализация содержания жира в печени означает снижение содержания жира в печени (например, абсолютного содержания жира в печени), предпочтительно снижение содержания жира в печени до уровня типичного, здорового, не имеющего заболевания субъекта (т. е. субъекта, не страдающего одним или более заболеваниями/нарушениями, описанными в данном документе). В различных вариантах осуществления содержание жира в печени снижается до $< 5\%$ абсолютного жира в печени. Абсолютное содержание жира в печени $\geq 5\%$ связано со стеатозом печени (жировой болезнью печени), при этом абсолютное содержание жира в печени $< 5\%$ считается клинически нормальным для субъектов, не имеющих заболеваний (смотрите, например, Chalasani et al., 2018 *Hepatology*;67(1):328-357).

[00115] В клиническом исследовании фазы 2 в качестве средства для лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) эфруксифермин продемонстрировал беспрецедентные уровни эффективности, включая нормализацию содержания жира в печени и регресс фиброза приблизительно у половины пациентов после всего лишь 16 недель введения доз. Уникальность клинического профиля EFX подчеркивается также восстановлением здорового липопротеинового профиля, улучшением гликемического контроля (снижение уровня гемоглобина A1c на 0,6-0,9% среди пациентов с диабетом 2 типа, страдающих НАСГ) и снижением уровней мочевой кислоты (Harrison et al., 2021, *Nat Medicine* 27:1262-1271).

[00116] «Нуждающийся в этом субъект» представляет собой субъекта, такого как человек, которому принесло бы пользу введение фармацевтической композиции и который может иметь диагноз или симптомы любого из нарушений, описанных в данном документе. Например, субъект, нуждающийся в снижении уровней мочевой кислоты, может представлять собой субъекта, страдающего подагрой. Субъект, нуждающийся в способе реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, может страдать НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, или восстанавливаться от НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболевания, вызываемого неправильным сворачиванием белка.

[00117] В различных аспектах нарушение представляет собой заболевание, вызываемое неправильным сворачиванием белка. Неправильно свернутые белки могут вызывать различные патогенные ответы и, как полагают, являются причиной или по меньшей мере связаны с рядом заболеваний человека. Типовые заболевания, вызываемые неправильным сворачиванием белков, включают, но не ограничиваются этим, муковисцидоз, дефицит альфа-1-антитрипсина и транстиретиновую амилоидную кардиомиопатию. Способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту

фармацевтической композиции по изобретению в количестве, эффективном для достижения необходимого биологического ответа. В связанных аспектах способ включает введение фармацевтической композиции EFX как части терапевтической схемы, которая также включает введение молекулы-корректора неправильно свернутого белка или терапию на основе олигонуклеотидов для лечения заболевания, вызываемого неправильным сворачиванием белка (например, дефицита альфа-1-антитрипсина).

[00118] Термин «лечить», а также связанные с ним слова не обязательно подразумевают 100% или полное лечение или ремиссию. Скорее, существуют различные степени лечения, которые признаются специалистами в данной области как имеющие потенциальную пользу или терапевтический эффект. В связи с этим способы лечения заболевания или нарушения могут обеспечивать любую степень или любой уровень лечения. Кроме того, лечение, обеспечиваемое способом, может включать лечение одного или более состояний или симптомов или признаков заболевания, подлежащего лечению, и/или улучшение качества жизни субъекта, имеющего состояние или заболевание. Способ лечения по настоящему изобретению может обеспечивать ингибирование одного или более симптомов заболевания. Также способ лечения, обеспечиваемый способами по настоящему изобретению, может включать замедление или реверсию прогрессирования заболевания.

[00119] Улучшение качества жизни субъекта можно оценивать путем определения одного или более параметров качества жизни, используя, например, Европейский опросник оценки качества жизни из 5 вопросов (EQ-5D) для определения подвижности, настроения, глобального влияния на качество жизни пациентов по предоставленным пациентами данным. Опросник EQ-5D также включает визуально-аналоговую шкалу (ВАШ), с помощью которой респонденты могут сообщать о своем субъективном состоянии здоровья. Смотрите, например, Balestroni et al., *Monaldi Arch Chest Dis.* 2012 Sep;78(3):155-9, которая в полном объеме включена посредством ссылки. Лечение также можно отслеживать, используя опросник по заболеваниям печени. Смотрите, например, Younossi et al., *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019 Sep;17(10):2093-2100.e3, которая в полном объеме включена посредством ссылки. Лечение печени также можно отслеживать путем измерения объективных параметров, таких как гистологические данные (например, регресс фиброза, разрешение НАСГ и т. п.) и биомаркеры повреждения печени (например, аланин-аминотрансфераза (АЛТ), аспартат-трансаминаза (АСТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ) и/или щелочная фосфатаза (ЩФ)). Типовые способы гистопатологической оценки печени у пациентов с НАСГ описаны, например, в Kleiner et al., 2005 *Hepatology* 41, 1313, которая в полном объеме включена посредством ссылки.

[00120] В связи с вышеописанными способами, композицию можно вводить любым подходящим путем введения, включая внутривенный, внутрибрюшинный, внутримозговой (интрапаренхимальный), внутримышечный, внутриглазной, внутриартериальный, внутрипортальный, интрамедуллярный, интратекальный, интравентрикулярный, внутрикожный, трансдермальный, подкожный, интраназальный,

ингаляционный (например, верхние и/или нижние дыхательные пути), энтеральный, эпидуральный, уретральный, вагинальный или ректальный пути введения. В различных случаях композицию вводят субъекту внутривенно, внутримышечно или подкожно. Например, в некоторых аспектах композицию вводят подкожно. Количество или доза EFX во вводимой композиции (т. е. «эффективное количество») должны быть достаточными для обеспечения необходимого биологического эффекта у субъекта в клинически целесообразных временных рамках.

[00121] В юрисдикциях, которые запрещают патентовать способы, практически реализуемые на человеке, значение «введения» композиции субъекту-человеку может быть ограничено назначением контролируемого вещества, которое субъект-человек может самостоятельно ввести себе любым способом (например, путем инъекции, введения и т. д.). В изобретении предусмотрено применение фармацевтической композиции для лечения любого из описанных в данном документе заболеваний или нарушений. В изобретении дополнительно предусмотрено применение композиции в изготовлении лекарственного средства для лечения любого из описанных в данном документе заболеваний или нарушений. В изобретении дополнительно предложена описанная в данном документе композиция для применения в лечении любого из упоминаемых в данном документе заболеваний или нарушений. В юрисдикциях, которые не запрещают патентовать способы, практически реализуемые на человеке, «введение» композиций включает как способы, практически реализуемые на человеке, так и предшествующие действия.

[00122] В дополнительном аспекте предложены наборы, которые содержат описанную в данном документе фармацевтическую композицию, упакованную способом, который облегчает введение субъектам. В одном аспекте набор содержит описанные в данном документе фармацевтическую композицию/состав, упакованные в контейнер, такой как герметично закрытая бутылка, сосуд, одноразовый или многоразовый флакон, предварительно наполненное устройство (например, шприц) или предварительно наполненное инъекционное устройство, необязательно с этикеткой, крепящейся к контейнеру или включенной в упаковку, на которой описано применение фармацевтической композиции при практической реализации способа. В одном аспекте фармацевтическая композиция упакована в стандартной лекарственной форме. Набор может содержать устройство, подходящее для введения фармацевтической композиции в соответствии с конкретным путем введения, хотя это необязательно. Например, в изобретении предложено двухкамерное устройство для доставки описанной в данном документе фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту. Двухкамерные устройства представляют собой комбинированные продукты, содержащие описанную в данном документе лиофилизированную фармацевтическую композицию и разбавитель в двух отдельных камерах устройства. Предварительно наполненные двухкамерные устройства (ДКУ) представляют собой комбинированные продукты, содержащие лиофилизированный лекарственный препарат и разбавитель в двух отдельных камерах

устройства. ДКУ обеспечивают высокую стабильность и удобство для пациентов и врачей, что значительно повышает качество продукции, соблюдение пациентами схемы лечения и конкурентоспособность на рынке. Кроме того, ДКУ обеспечивают герметичность, стерильность и совместимость с биофармацевтическими препаратами, а также предотвращают протекания и травмы от укола иглой. Подходящие двухкамерные устройства для применения в связи с настоящим изобретением описаны в данной области техники. Смотрите, например, Ingle R., Fang W. (2021). *Int. Journal of Pharmaceutics* 597, 12031.

[00123] Нижеприведенные примеры иллюстрируют репрезентативные признаки изобретения. Из описания этих аспектов можно получить и/или реализовать на практике другие аспекты изобретения на основании приведенного ниже описания. Способы включают применение методик молекулярной биологии, описанных в трактатах, таких как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; и *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., ed., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

ПРИМЕРЫ

[00124] Пример 1: Составы эфруксифермина

[00125] В этом примере описаны составы EFX, которые оценивали в исследованиях, описанных ниже.

[00126] Исходные инъекционные белковые биопрепараты часто составлены при слабокислом или нейтральном pH в диапазоне от pH 5,2 до приблизительно pH 6,9, чтобы минимизировать посттрансляционные модификации, такие как дезамидирование или окисление, которые превращают остатки аспарагина в белке в аспарагиновую или изоаспарагиновую кислоту в качестве промежуточного сукцинимиды, а глутамин - в глутаминовую или пироглутаминовую кислоту. При pH выше 7,6 часто наблюдают дезамидирование (образование кислотных зарядовых вариантов), что приводит к потере стабильности, функциональности и/или активности белка. Ниже pH 7,0 также наблюдают образование основных зарядных вариантов.

[00127] В попытке минимизировать дезамидирование, окисление и образование зарядовых вариантов, были разработаны составы EFX с рядом эксципиентов в диапазоне pH 4,5-7,0. Удивительно, но вязкоупругие свойства EFX резко менялись при pH ниже 6,5, что проявлялось в гелеподобном поведении, разделении фаз и потере текучести. Эти особенности являются проблематичными для инъекционного состава биопрепарата. Высокая динамическая вязкость этих гелей (в некоторых случаях до 23950 сП (сантипуаз)), а также длительная стабильность гелей (в некоторых случаях до 21 месяца при хранении при 2-8 °C) свидетельствуют об образовании упорядоченной, стабильной трехмерной структуры, возможно, в результате наличия перекрестно сшитых водородных связей, объединенных в структурированную решетку.

[00128] Кроме того, большинство исследуемых составов при pH 6,9 или ниже демонстрировали подверженность агрегации белков, усечению/фрагментации и/или

образованию видимых и невидимых невооруженным глазом частиц. Такие изменения нежелательны для инъекционных биопрепаратов, поскольку они могут быть связаны с проблемами безопасности (в частности, иммуногенностью), нестабильностью и потерей активности.

[00129] Таким образом, для разработки состава EFX провели серию исследований, направленных на минимизацию путей деградации и посттрансляционных модификаций (таких как повышенное образование зарядовых вариантов), а также на преодоление уникальной подверженности EFX образованию перекрестно-сшитых структур водородных связей, что приводит к образованию геля и значительному разделению фаз.

[00130] Составы EFX, которые оценивали в примере 1 и последующих примерах, перечислены в таблице 1, а используемые эксципиенты и химические вещества - в таблице 2.

[00131] **Таблица 1:** Оцененные составы EFX*.

Состав	Композиция состава	Диапазон концентрации EFX, мг/мл
F1	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 4,5	До 100 ± 10
F2	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	До 100 ± 10
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,0	До 100 ± 10
F4	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 200 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	До 100 ± 10
F5	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,2	До 100 ± 10
F6	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 5,2	До 100 ± 10
F7	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,2	До 100 ± 10
F8	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 120 мМ NaCl, PS20, pH 5,2	До 100 ± 10
F9	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 5,5	До 100 ± 10
F10	20 мМ глицилглицина/глицилглицина-HCl, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,5	До 100 ± 10
F11	20 мМ гистидина/His-HCl, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 6,0	До 100 ± 10
F12	20 мМ His/His-HCl, 180 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 6,5	До 100 ± 10
F13	20 мМ His/His-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 7,0	До 100 ± 10

F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	От 28 до 100 ± 10
F18	20 мМ Трис/Трис-HCl, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,8	От 28 до 150 ± 15
F19	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 8,3	До 100 ± 10
F20	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 9,0	До 100 ± 10
F21	20 мМ гистидина, 220 сахарозы, 20 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 6,5	До 100 ± 10
F22	20 мМ Трис, 220 сахарозы, 20 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F23	20 мМ гистидина, 220 сахарозы, 20 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 6,5	До 100 ± 10
F24	20 мМ Трис, 220 сахарозы, 20 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F25	20 мМ гистидина, 100 сахарозы, 140 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 6,5	До 100 ± 10
F26	20 мМ Трис, 100 сахарозы, 140 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F27	20 мМ гистидина, 100 сахарозы, 140 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 6,5	До 100 ± 10
F28	20 мМ Трис, 100 сахарозы, 140 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 7,5	До 100 ± 10
F29	20 мМ гистидина, 160 сахарозы, 80 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 7,0	До 100 ± 10
F30	20 мМ Трис, 160 сахарозы, 80 мМ Arg/глутамата, PS20, pH 7,5	От 50 до 100 ± 10
F31	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,02% масс./об. PS20, pH 7,3	До 100 ± 10
F32	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,02% масс./об. PS80, pH 7,3	До 100 ± 10
F33	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	До 150 ± 15
F34	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS80, pH 7,3	До 100 ± 10
F35	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы,	До 100 ± 10

	0,1% масс./об. PS20, pH 7,3	
F36	20 mM Трис-HCl, 120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, 0,1% масс./об. PS80, pH 7,3	До 100 ± 10
F37	120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	До 100 ± 10
F38	120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, 0,06% масс./об. PS80, pH 7,3	До 100 ± 10
F39	120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, 0,06% масс./об. PS80, pH 6,9	До 100 ± 10
F40	120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, 0,06% масс./об. PS80, pH 7,7	До 100 ± 10
F41	20 mM Трис-HCl, 120 mM Arg/Arg-HCl, 120 mM сахарозы, pH 7,3	До 100 ± 10
F42	40 mM Arg/Arg-HCl, 180 mM сахарозы, 0,04% масс./об. PS20, pH 7,3	До 100 ± 10

*Обозначение состава (скрининговое исследование эксципиентов/pH F1-F20; исследование Arg/Glu/pH F21-F30 конформационной стабильности, а также минимизации агрегации и образования зарядовых вариантов; исследование F31-F42 поверхностно-активных веществ). Концентрация полисорбата 20 составляла 0,04% масс./об., если в таблице не указано иное. Все перечисленные аминокислоты находятся в естественном состоянии (т. е. L-изомеры).

[00132] **Таблица 2:** Обзор эксципиентов и химических веществ, используемых при разработке состава EFX.

Материал
L-гистидин, эксципиент Ph. Eur., USP, JP
Янтарная кислота
Трис-основание, ≥ 99,9%, EP, USP
Трис-HCl, Emprove Expert
D(+) сахароза, USP-NF, BP, Ph. Eur., JP
α,α-трегалозы дигидрат, высокая чистота (низкий уровень эндотоксинов), USP/NF, EP, JP, ChP, 25 кг
Полисорбат 20
L-аргинин, основание, Ph. Eur., USP
L-глутаминовая кислота, Ph. Eur., USP
Хлористоводородная кислота, 1 н.
Хлористоводородная кислота, 2 н.
Натрия дигидрофосфата дигидрат, Ph. Eur., USP

Динатрия гидрофосфат додекагидрат, Ph. Eur., USP
Хлорид натрия, Ph. Eur., USP
Раствор гидроксида натрия, 2 н.
Раствор гидроксида натрия, 1 н.
L(+)-лизина моногидрохлорид
L-метионин, Ph. Eur., USP
Уксусная кислота, ледяная, Ph. Eur., USP
Глицилглицин
Дигидрогенфосфат калия, USP
Ангидрид фосфата калия, USP
Цитрат натрия, USP, EP, JP
Na-карбоксиметилцеллюлоза
ПЭГ-4000

[00133] Пример 2: Изучение характеристик составов: Образование геля и разделение фаз (шлирен-разделение фаз)

[00134] В этом примере описаны физические свойства различных составов, описанных в данном документе. Удивительно, но EFX подвержен гелеобразованию и фазовому разделению при составлении и хранении в условиях, которые подходят для большинства других биопрепаратов.

Внешний вид

[00135] Составы EFX проверяли в отношении образования геля, разделения фаз, опалесценции, наличия или отсутствия видимых частиц при мягком, ручном, радиальном перемешивании в течение 5 секунд на белом фоне и в течение 5 секунд на черном фоне в соответствии с Европейской фармакопеей (9-е издание; монография 2.9.20) при яркости 2000-3750 люкс. Для классификации наблюдаемых видимых частиц применяли числовую оценку на основании «Deutscher Arzneimittel-Codex» (DAC 2006), как указано в таблице 3. Волокноподобные структуры, частицы, которые скорее всего не являются характерными, и дополнительные характеристики образца документировали, как описано в таблице 4.

[00136] **Таблица 3:** Численная оценка для видимых частиц, за исключением волокон и частиц, являющихся не характерными.

Оценка видимых частиц	Описание
0	В течение 5 с частиц не видно
1	В течение 5 с видно небольшое число частиц
2	В течение 5 с видно среднее число частиц
10	Непосредственно видно большое число частиц

[00137] **Таблица 4:** Буквенный код для дополнительных характеристик внешнего

вида и наблюдений

Буква	Описание
А	Пузырьки воздуха
С	Цвет
F	Волокна (одиночные)
FF	Множество волокон (более одного)
Н	Ураган, торнадо, например, из-за осаждения или плавающих частиц
L	Частицы на границе видимости как различимые частицы
S	Шлиры*, разделение фаз
T	Мутность, опалесценция, непрозрачность, замутненность
V	Вязкость
X	Нехарактерные частицы: металл, блеск, частицы резины, расслоение стекла

* Шлиры представляют собой оптические неоднородности, которые можно наблюдать в средах с неоднородным показателем преломления, например, в жидких средах, состоящих из различных жидкостей или жидких фаз, имеющих разную плотность. Например, причиной шликера может быть недостаточное смешивание или разделение фаз.

Концентрация белка (разделение фаз, шликер-разделение фаз)

[00138] Концентрацию EFX определяли методом УФ/видимой спектроскопии, используя угловую спектроскопию, на приборе SoloVPE, измеряющем поглощение на 280 нм.

Вязкость (образование геля)

[00139] Динамическую вязкость измеряли, используя реометр Kinexus ultra plus (Malvern Instruments). Реометр был оснащен установкой с конической пластиной (диаметр конуса 40 мм, угол 1°). Размеры измерительного конуса CP1/40 фиксировали измерительный зазор на уровне 0,024 мм, для чего был необходим объем образца ~ 310 мкл. Чтобы избежать высыхания поверхности образца, применяли блокатор испарения. Измерения проводили при постоянной скорости сдвига 400 с⁻¹ при 25 °С в течение 3 минут. Кроме того, было составлено 11 таблиц данных при повышении скорости сдвига от 10 с⁻¹ до 1000 с⁻¹ при 25 °С.

Масс-спектрометрия водородно-дейтериевого (H-D) обмена гуанидиния/мочевины

[00140] Гелеобразование и фазовое разделение EFX в составах F1, F2, F4, F7, F8, F9 и F11 происходит в результате наличия перекрестно-сшитых водородных связей, образующих структурную решетку. Исследования с использованием H-D обмена проясняют механизм образования решетки и шликер-разделения фаз.

Сводные данные: Образование геля и разделение фаз (шликер-разделение фаз)

[00141] Изоэлектрическая точка (pI) EFX, теоретическая и измеренная с помощью кИЭФв, соответствует приблизительно рН 6,6. Составы F1-F12 были составлены при рН

ниже рI, тогда как значения рН составов F13-F20 были выше рI (смотрите таблицу 1). EFX в составах, полученных ниже рН 6,5 (составы с низким или нейтральным рН), демонстрировал подверженность гелеобразованию или разделению фаз. Изображения геля, образуемого составами EFX, приведены на Фиг. 2. Состав F11 образовывал плотный 3-D-структурированный гель вскоре после составления. После хранения при 40 °C/75% ОВ в течение трех дней составы F1, F2, F4, F7, F8 и F9 также демонстрировали образование геля, разделение фаз и/или осаждение. В составах F1, F2, F4 и F7 образовывался полупрозрачный гель, демонстрирующий высокую мутность (Фиг. 7).

[00142] В составах F8, F9 и F12 наблюдали разделение фаз (шлирен-разделение фаз) с белой гелеподобной фазой внизу и мутным жидким супернатантом сверху, наблюдаемое через 3 дня при 40 °C/75% ОВ. Например, концентрация белка, измеренная в нижней фазе F12 с помощью SoloVPE, составляла 163,1 мг/мл, а в верхней фазе супернатанта - 59,9 мг/мл. Кроме того, после двух недель хранения при 40 °C/75% ОВ составы F5 и F6 демонстрировали схожие резкие изменения внешнего вида и вязкоупругих свойств.

[00143] При относительной влажности 25 °C/60% составы F2 и F8 образовывали плотные гели, соответственно, через 1 неделю и 1 месяц хранения. Кроме того, разделение фаз и образование видимых частиц наблюдали для F14 после одного месяца хранения при 25 °C/60% ОВ, но не для других температурных условий (2-8 °C и 40 °C/75% ОВ).

[00144] Динамическая вязкость EFX при концентрации 100 мг/мл в составах F1-F20 (кроме F11) при 400 с⁻¹ и в нулевой момент времени представлена на Фиг. 3. Измеренные значения динамической вязкости зависят от рН, увеличиваясь при более низком рН. Например, вязкость составов EFX от F14 до F20 при 100 мг/мл и комнатной температуре, все при рН 7,0 и выше, составляла ≤ 5 сП. Для сравнения, измеренная динамическая вязкость находилась в диапазоне от 10 до 16 сП непосредственно после получения составов F1-F10 при рН 6,5 и ниже (Фиг. 3). В составе 11 (F11) EFX мгновенно образовывал плотную/жесткую гелевую решетку при получении, что сделало невозможным дальнейшую экспериментальную оценку динамической вязкости.

[00145] При хранении EFX в различных условиях другие составы при рН 6,5 или ниже претерпели разделение фаз и образовали высоковязкие гели (F1, F2, F4, F7, F8, F9, F10 и F11). Образование геля, по-видимому, было результатом наличия перекрестно-сшитых водородных связей, образующих структурную решетку, что привело к образованию высокожесткой трехмерной структуры. Скорость образования геля EFX зависела от температуры хранения: при 40 °C оно происходило в течение приблизительно 3 дней, а при 25 °C и 2-8 °C - через недели или месяцы, соответственно. После образования трехмерные гелевые решетки были стабильными или необратимыми, о чем свидетельствуют составы F1, F2, F4, F7, F8, F9 и F11, сохранявшие свой гелеподобный вид через 21 месяц при различных условиях хранения.

[00146] На Фиг. 4 проиллюстрирована динамическая вязкость EFX при 100 мг/мл для составов F1-F20 (за исключением F11) при скорости сдвига 10 с⁻¹ через 3 дня при 40

°С. Те составы, которые образовывали гели, имеют динамическую вязкость в десятки тысяч сП. Динамическая вязкость EFX оставалась неизменной после хранения в течение 21 месяца при 2-8 °С (Фиг. 4 и таблица 5). Например, измеренная динамическая вязкость составов F2 и F10 при низкой скорости сдвига достигала 23950 сП и 10560 сП, что сравнимо с текучей силиконовой резиной и шоколадным сиропом, соответственно.

[00147] Составы F1, F2, F4, F7, F8, F9 и F11 образовывали необратимые гели и претерпевали разделение фаз, демонстрируя явно разные вязкоупругие свойства в зависимости от скорости сдвига, по сравнению с гомогенными жидкими составами, такими как F13-F42. Как показано на Фиг. 5, динамическая вязкость EFX в составах F13-F20, а также F21-F42 (не показано), в зависимости от увеличения скорости сдвига оставалась постоянной, демонстрируя, таким образом, ньютоновское поведение. В противоположность этому, вязкость составов F1, F2, F4, F7, F8, F9 и F11 уменьшалась при увеличении скорости сдвига, демонстрируя, таким образом, эффект неньютоновского сдвигового разрежения. Несмотря на это, они оставались гелеобразными, что указывает на достаточную стабильность связанных водородными связями решеток, чтобы выдерживать высокие скорости сдвига (например, 1000 c^{-1}). Помимо зависимости от pH, образование геля и разделение фаз также зависели от эксципиентов, входящих в каждый состав. Иллюстрацией этого является то, что разные композиции эксципиентов при одинаковом pH для F1, F2, F4, F7, F8, F9 и F11 были связаны с широким диапазоном динамической вязкости. Такие различия наблюдали как при низких, так и при высоких скоростях сдвига, демонстрируя, таким образом, что вязкоупругие свойства проявляют сильную зависимость от природы конкретных эксципиентов. Значения динамической вязкости при низкой скорости сдвига приведены в таблице 5А, а при скорости сдвига 1000 c^{-1} - в таблице 5В.

[00148] **Таблица 5А:** Динамическая вязкость 100 мг/мл EFX в составах F1-F20 (за исключением F11) при скорости сдвига 10 c^{-1} через 3 дня при 40 °С с последующим хранением в течение 21 месяца при 2-8 °С.

Состав	Композиция состава	Вязкость [сП]
F1	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 4,5	12770
F2	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	23950
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,0	21
F4	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 200 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	9920
F5	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,2	41
F6	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20,	22

	pH 5,2	
F7	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,2	9279
F8	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 120 мМ NaCl, PS20, pH 5,2	10560
F9	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 5,5	3878
F10	20 мМ глицилглицина/глицилглицина-HCl, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,5	22
F11	20 мМ гистидина, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 6,0	UM*
F12	20 мМ His/His-HCl, 180 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 6,5	10,0
F13	20 мМ His/His-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 7,0	9,5
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, pH 7,5	5,1
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,5	4,9
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, pH 7,5	5,1
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	4,9
F18	20 мМ Трис/Трис-HCl, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,8	4,4
F19	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 8,3	6,0
F20	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 9,0	3,9
F33	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	3,7

[00149] **Таблица 5В:** Динамическая вязкость 100 мг/мл EFX в составах F1-F20 (за исключением F11) при скорости сдвига 1000 с^{-1} через 21 месяц при 2-8 °С.

Состав	Композиция состава	Вязкость [сП]
F1	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 4,5	206
F2	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	134
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,0	16
F4	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 200 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 5,0	271
F5	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,2	21
F6	20 мМ ацетата Na/уксусной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 5,2	16
F7	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы,	344

	PS20, pH 5,2	
F8	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 120 мМ NaCl, PS20, pH 5,2	50
F9	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 5,5	76
F10	20 мМ глицилглицина/глицилглицина-HCl, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,5	15
F11	20 мМ гистидина, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 6,0	UM*
F12	20 мМ His/His-HCl, 180 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 6,5	10,0
F13	20 мМ His/His-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 7,0	10,0
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, pH 7,5	5,0
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,5	5,0
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, pH 7,5	5,0
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	5,0
F18	20 мМ Трис/Трис-HCl, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,8	5,0
F19	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 8,3	5,0
F20	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 9,0	5,0
F33	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	4,0

[00150] Для дальнейшей разработки были выбраны составы F15, F16, F17, F18, F20 и F33-F42 ($\text{pH} \geq 6,5$) на основании их ньютоновского поведения в зависимости от скорости сдвига, очень низкой вязкости и отсутствия гелеобразования или значительного шликрен-разделения фаз.

[00151] **Пример 3: Оценка образования зарядовых вариантов, агрегации белка, усечения/фрагментации, клеточной активности**

[00152] Помимо сохранения ньютоновского поведения и низкой вязкости раствора, описанные в данном документе составы EFX оценивали в отношении агрегации в высокомолекулярные виды (ВММ), усечения/фрагментации в низкомолекулярные виды (НММ), образования невидимых невооруженным глазом (ННГ) и видимых частиц, а также посттрансляционных модификаций, приводящих к образованию более кислотных или основных зарядовых вариантов. Скорость образования заряженных видов является большей для EFX по сравнению с другими белками в целом при температурах охлаждения, при этом скорость образования повышается при комнатной температуре. В этом примере описаны исследования, проводимые в попытке минимизировать, например, образование заряженных видов, ВММ и т. п.

Посттрансляционные модификации Определение зарядовых вариантов EFX

[00153] Зарядовую гетерогенность EFX оценивали с помощью анионообменной хроматографии (АО-ВЭЖХ) и капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (КИЭФв). Эти два способа позволяют разделять зарядовые варианты белков с использованием разных механизмов. Разделение методом АО-ВЭЖХ основано на взаимодействии открытых зарядов на поверхности белка с заряженной стационарной хроматографической матрицей. Разделение методом КИЭФв основано на электрофоретической миграции каждого зарядового варианта белка к своей изоэлектрической точке в градиенте pH, установленном в разделительном капилляре. Вследствие различия механизмов разделения АО и КИЭФв считаются взаимодополняющими и ортогональными методами оценки зарядовой неоднородности белков.

Оценка зарядовых вариантов с помощью анионообменной хроматографии (АО-ВЭЖХ)

[00154] Распределение зарядовой гетерогенности в составах EFX оценивали, используя колонку с анионообменной смолой TSK-Gel Q-STAT (4,6 мм x 100 мм, размер частиц 7 мкм) с выявлением УФ-поглощения на 230 нм. Отрицательно заряженный EFX связывается с положительно заряженной матрицей колонки, уравновешенной в 20 мМ Трис и забуференной до pH 8, содержащей 20% (об./об.) ацетонитрила. Слабозаряженные варианты EFX легко вытесняются из хроматографической колонки низкой концентрацией соли, в то время как для вытеснения более отрицательно заряженных вариантов EFX необходима более высокая концентрация соли. Солевой градиент представлял собой линейный градиент 0,7 М хлорида натрия, pH 8,0, при скорости потока 0,5 мл/мин. Температуру хроматографической колонки поддерживали при 30 °С в течение всего анализа.

[00155] Репрезентативная АО-ВЭЖХ хроматограмма EFX, составленного в F18, показана на Фиг. 6, а площади пре-, пост- и основных пиков количественно определены и обобщены в таблице 6. В целях хроматографического анализа зарядовые варианты в EFX сгруппированы как пре-пики (более основные варианты или зарядовые варианты EFX с меньшим отрицательным зарядом на поверхности), основной пик и пост-пики (более кислотные варианты или зарядовые варианты EFX с большим отрицательным зарядом на поверхности).

[00156] **Таблица 6:** Распределение зарядовых вариантов в составе EFX F18, разделенных методом АО-ВЭЖХ.

Пик	Процентное содержание [±] (%)
% основного пика	62,0
% основных пиков (пре-пиков)	8,7
% кислотных пиков (пост-пиков)	29,3

[±]На основании общей площади пиков на хроматограмме.

Оценка зарядовых вариантов с помощью изоэлектрического фокусирования с

визуализацией (кИЭФв)

[00157] Для экспериментального подтверждения изоэлектрической точки (pI) EFX был разработан метод капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (кИЭФв) с использованием ProteinSimple iCE3. EFX в различных составах готовили в смеси, содержащей амфолитный раствор, 3 М мочевины и маркеры, соответствующие pI 5,85 и pI 8,18. Разделение зарядовых вариантов проводили в капилляре с покрытием с внутренним диаметром 100 мкм и длиной 50 мм при температуре окружающей среды, при этом пики белков отслеживали по поглощению на 280 нм. Зарядовые варианты разделяли, используя два различных этапа фокусировки: сначала 1000 В в течение минуты, затем 10 минут мобилизации при 3000 В.

[00158] Основной пик EFX в составе F18 мигрировал с кажущейся pI 6,67, что хорошо согласуется с теоретической pI приблизительно 6,5 (Фиг. 7). Дополнительные пики зарядовых вариантов были выявлены на электроферограмме на низком уровне, мигрируя в положение либо до (кислотные варианты), либо после (основные варианты) основного пика. Распределение кислотных, основных и главных пиков, выраженных в процентах от площади пика, приведено в таблице 7. Распределение пре-пиков, основного пика и пост-пиков на электроферограмме кИЭФв отражает распределение пре-пиков, основного пика и пост-пиков, полученное методом АО-ВЭЖХ.

[00159] **Таблица 7:** Распределение зарядовых вариантов в составе EFX F18, разделенных методом кИЭФв.

Пик	pI	Процентное содержание [±] (%)
% основного пика	6,67	57,4
% кислотных пиков	< 6,60	32,7
% основных пиков	> 6,70	9,8

кИЭФв=капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией. [±]На основании общей площади пиков на электроферограмме.

[00160] Образование зарядовых вариантов при хранении при 25 °C/60% ОВ, проиллюстрированное как уменьшение основного пика EFX с течением времени для F1-F20 по сравнению с F33, показано на Фиг. 8А. Примечательно, что в течение 4 недель хранения EFX, составленный в Трис-НСl, содержащем Arg/Arg-НСl, сахарозу, PS20 или PS80 (F33-F38), забуференном в диапазоне рН от 7,0 до 7,6, демонстрировал приблизительно на 60% меньшую скорость уменьшения основного пика, чем EFX в F18, и более чем в 2 раза меньшую скорость образования более кислотных зарядовых вариантов, чем EFX в F20.

[00161] Кроме того, на Фиг. 8В показано относительное количество в процентах от общей площади пика на хроматограмме для более основных зарядовых вариантов (пре-пики), измеренное методом АО-ВЭЖХ, а на Фиг. 8С проиллюстрирован процент пост-пиков, соответствующих более кислотным вариантам в нулевой момент времени, через 1 неделю и 1 месяц при 25 °C/60% ОВ для составов F1-F20. Как видно из Фиг. 8В, основные

зарядовые варианты или пре-пики значительно более многочисленны в составах F1-F12, где F1 демонстрирует 53% основных вариантов, по сравнению с составами F15-F20 и F33, где основные варианты остаются относительно постоянными и составляют менее 10% от общей площади хроматограммы. В противоположность этому, составы F15-F20 демонстрируют большее образование кислотных вариантов после хранения в течение одного месяца при 25 °С/60% ОВ (таблица 8).

[00162] Улучшенная стабильность F33 была также очевидна при хранении при 2-8 °С, при этом скорость образования зарядовых вариантов EFX была приблизительно на 50% ниже, чем в F18, и в 3,2 раза ниже, чем в F20 (таблица 9).

[00163] Таким образом, F33 с уникальной комбинацией эксципиентов (т. е. сахара, поверхностно-активного вещества и Arg/Arg-HCl) была наиболее стабильной фармацевтической композицией в виде жидкого состава (по сравнению с тестируемыми составами), при этом основной пик EFX оставался относительно неизменным с течением времени при хранении при 2-8 °С (Фиг. 9), что подтверждается наименьшей скоростью образования зарядовых вариантов при 25 °С/60% ОВ по сравнению с составами, содержащими другие эксципиенты, обычно используемые в белковых биофармацевтических препаратах.

[00164] **Таблица 8:** Скорость образования зарядовых вариантов EFX в выбранных составах*, хранимых при 25 °С, выраженная как процент потери чистоты по данным АО-ВЭЖХ (на основании % уменьшения площади основного пика) в неделю.

Состав	Композиция	Скорость образования зарядовых вариантов [%/неделя]
F33	20 мМ Трис-HCl, 120 мМ Arg/Arg-HCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	-4,68
F18	20 мМ Трис/Трис-HCl, 160 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,8	-7,66
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,0	-5,55
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, pH 7,5	-8,25
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-HCl, PS20, pH 7,5	-5,38
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, pH 7,5	-5,85
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-HCl, PS20, pH 7,8	-5,36
F19	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 8,3	-6,85
F20	20 мМ Трис/Трис-HCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 9,0	-9,97

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, были

исключены.

[00165] **Таблица 9.** Скорость образования зарядовых вариантов EFX в выбранных составах*, хранимых при 2-8 °С, выраженная как процент потери чистоты по данным АО-ВЭЖХ (как % уменьшения площади основного пика) в месяц.

Состав	Композиция	Скорость образования зарядовых вариантов [%/месяц]
F33	20 мМ Трис-НCl, 120 мМ Arg/Arg-НCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, pH 7,3	-1,52
F18	20 мМ Трис/Трис-НCl, 160 мМ Lys-НCl, PS20, pH 7,8	-3,28
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, pH 5,0	-1,70
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, pH 7,5	-1,80
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НCl, PS20, pH 7,5	-2,00
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, pH 7,5	-2,00
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-НCl, PS20, pH 7,8	-2,00
F19	20 мМ Трис/Трис-НCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 8,3	-2,50
F20	20 М Трис/Трис-НCl, 220 мМ сахарозы, PS20, pH 9,0	-5,20

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, были исключены.

Оценка размерных вариантов (агрегация и фрагментация) с помощью ЭХ-ВЭЖХ

[00166] Молекулярные размерные варианты EFX, возникающие вследствие агрегации (образование высокомолекулярных видов (ВММ)) или фрагментации (образование низкомолекулярных видов (НММ)), характеризовали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ЭХ-ВЭЖХ), используя силикагелевую фильтрационную колонку (Tosho G3000 SWXL) с выявлением УФ-поглощения на 280 нм. Подвижная фаза состояла из 100 мМ фосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия, pH 6,9. Размерные варианты EFX элюировали изократически из колонки при 0,5 мл/мин при комнатной температуре, а количественную оценку пиков проводили, используя детектор УФ-поглощения. Размерные варианты EFX разделялись на основной вид, преобладающий хроматографический пик, и низкие уровни димера (состоящего из двух гомодимеров EFX) и высокомолекулярных (ВММ) размерных вариантов EFX, как показано на Фиг. 10.

[00167] Образование размерных вариантов во время хранения выбранных составов F1-F20 и F33 при 25 °С проявлялось как уменьшение основного пика EFX по данным ЭХ-

ВЭЖХ, как показано на Фиг. 11. Составы, содержащие буфер Трис-НСl, Arg/Arg-НСl, сахарозу, PS20 или PS80 (F33-F38), забуференные в диапазоне рН от 7,0 до 7,6, имели меньшую скорость уменьшения основного пика, чем другие составы при 25 °С, а именно на 70% меньшую, чем F18, и более чем в 15,9 раза меньшую, чем F14 (таблица 10). При хранении при 2-8 °С скорость образования размерных вариантов (ВММ и НММ) EFX в F33 также была приблизительно на 50% ниже, чем для F18, и в 20 раз ниже, чем для F14, как пример (таблица 11). Уникальная комбинация EFX с эксципиентами, входящими в состав F33 (и в указанных концентрациях), гарантировала, что профиль размерных вариантов EFX оставался относительно неизменным с течением времени при хранении при 2-8 °С (Фиг. 12). Аналогично, при хранении в более стрессовых условиях при 25 °С F33 демонстрировал наименьшую скорость образования зарядовых вариантов (Фиг. 11) по сравнению с составами на основе других эксципиентов, обычно используемых для белковых биофармацевтических препаратов.

[00168] **Таблица 10.** Скорость образования размерных вариантов EFX в выбранных составах*, хранимых при 25 °С, выраженная как потеря чистоты (как % уменьшения площади основного пика) по данным ЭХ-ВЭЖХ в неделю

Состав	Композиция состава	Скорость образования размерных вариантов [%/неделя]
F33	20 мМ Трис-НСl, 120 мМ Arg/Arg-НСl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, рН 7,3	-0,16
F18	20 мМ Трис/Трис-НСl, 160 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,8	-0,50
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, рН 5,0	-1,38
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, рН 7,5	-3,12
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,5	-0,63
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, рН 7,5	-0,57
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-НСl, PS20, рН 7,8	-0,62
F19	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 8,3	-0,89
F20	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 9,0	-0,73

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, исключены.

[00169] **Таблица 11.** Скорость образования размерных вариантов EFX в выбранных составах, хранимых при 2-8 °С, выраженная как процент потери чистоты (как % уменьшения площади основного пика) по данным ЭХ-ВЭЖХ в месяц

Состав	Композиция состава	Скорость образования размерных вариантов [%/месяц]
F33	20 мМ Трис-НCl, 120 мМ Arg/Arg-НCl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, рН 7,3	-0,14
F18	20 мМ Трис/Трис-НCl, 160 мМ Lys-НCl, PS20, рН 7,8	-0,30
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, рН 5,0	-0,20
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, рН 7,5	-2,80
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НCl, PS20, рН 7,5	-1,80
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, рН 7,5	-1,80
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-НCl, PS20, рН 7,8	-2,20
F19	20 мМ Трис/Трис-НCl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 8,3	-1,70
F20	20 мМ Трис/Трис-НCl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 9,0	-1,20

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, исключены.

Оценка размерных вариантов (Вмм и НММ) с помощью КЭ-ДСН (в невосстанавливающих условиях)

[00170] Для оценки чистоты EFX использовался капиллярный электрофорез с додецил-сульфатом натрия (КЭ-ДСН). В этом методе использовали восстановленный, денатурированный EFX, а также невосстановленный, денатурированный EFX.

[00171] Размерные варианты EFX количественно оценивали с помощью КЭ-ДСН в денатурирующих, невосстанавливающих условиях. EFX смешивали с 100 мМ натрий-фосфатным буфером при рН 6,5 и 10% (об./об.) раствором ДСН перед добавлением 140 мМ N-этилмалеимида (NEM) при комнатной температуре. Затем образец анализировали в 20 см кварцевом капилляре без покрытия (внутренний диаметр 50 мкм) с помощью аналитической системы Beckman PA800 Plus Pharmaceutical, оснащенной детектором с фотодиодной матрицей, отслеживающим поглощение на 220 нм. Данные каждого электрофоретического анализа получали с помощью программного обеспечения для сбора данных 32 Karat.

[00172] Анализ невосстановленного, денатурированного EFX показал, что основным пиком является интактный белок. Одноцепочечные и низкомолекулярные виды мигрируют в положение перед основным пиком в виде пре-пиков. Агрегаты EFX были объединены после основного пика в виде пост-пиков, как показано на репрезентативной электроферограмме EFX (Фиг. 13).

[00173] Образование размерных вариантов EFX в выбранных составах, хранимых при 25 °С, проявлялось как уменьшение основного пика с течением времени по данным КЭ-ДСН (в невозстанавливаемых условиях), как показано на Фиг. 14, а хранимых при 2-8 °С - на Фиг. 15. Размерные варианты во всех составах оставались относительно неизменными с течением времени, когда составы EFX хранились при 2-8 °С (Фиг. 15). При 25 °С потеря чистоты была большей, например, в F1 (-7,04%/неделя). Для сравнения, F33 демонстрировал улучшенную стабильность в этих условиях: размерные варианты образовывались приблизительно в 10 раз медленнее (-0,70%/неделя).

Оценка образования размерных вариантов (ВММ и НММ) с помощью ОФ-ВЭЖХ

[00174] Метод ОФ-ВЭЖХ предусматривает разделение EFX на колонке Zorbax 300SB C18 (4,6 мм x 150 мм, размер частиц 3,5 мкм) с использованием подвижной фазы из 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислоты в воде с двухфазным градиентом из 70% N-пропанола и 30% ацетонитрила при 45 °С и скорости потока 0,5 мл/мин. Пики элюированных белков определяют с помощью детектора УФ-поглощения на 280 нм.

[00175] Хроматограмма ОФ-ВЭЖХ для EFX приведена на Фиг. 16. Содержание разделенных пиков (пронумерованных от 1 до 7) было охарактеризовано с помощью потоковой масс-спектрометрии высокого разрешения и представлено в таблице 12.

[00176] Образование размерных вариантов в выбранных составах F1-F20 и F33, хранимых при 25 °С, проявлялось как уменьшение основного пика с течением времени по данным измерения ОФ-ВЭЖХ, как показано на Фиг. 17. Составы EFX, содержащие буфер Трис-НСl, Arg/Arg-НСl, сахарозу, PS20 или PS80 (F33-F38), забуференные в диапазоне рН от 7,0 до 7,6, имели приблизительно на 10% меньшую скорость уменьшения основного пика, чем состав F18 при 25 °С, и приблизительно в 6 раз меньшую скорость, чем состав F14 (таблица 10). При хранении при 2-8 °С скорость образования размерных вариантов (ВММ и НММ) в F33 также была приблизительно в половину ниже, чем для F18, и приблизительно в 30 раз ниже, чем скорость для F20 (таблица 13).

[00177] Хотя различные тестируемые составы благоприятно воздействовали на стабильность EFX, комбинация EFX с эксципиентами, входящими в состав F33 (т. е. сахар, поверхностно-активное вещество и Arg/Arg-НСl), была превосходящей, гарантируя, что профиль размерных вариантов EFX оставался относительно неизменным с течением времени при хранении при 2-8 °С (Фиг. 18). Аналогично, при хранении в более стрессовых условиях при 25 °С F33 демонстрировал наименьшую скорость образования зарядовых вариантов (Фиг. 17) по сравнению с составами на основе других комбинаций эксципиентов, обычно используемых для белковых биофармацевтических препаратов.

[00178] **Таблица 12:** Скорость образования размерных вариантов в выбранных составах EFX, хранимых при 25 °С, выраженная как потеря чистоты (как % уменьшения площади основного пика) по данным ОФ-ВЭЖХ в неделю.

Состав*	Композиция состава	Скорость образования
---------	--------------------	----------------------

		размерных вариантов [%/неделя]
F33	20 мМ Трис-НСl, 120 мМ Arg/Arg-НСl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, рН 7,3	-0,75
F18	20 мМ Трис/Трис-НСl, 160 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,8	-0,83
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, рН 5,0	-2,77
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, рН 7,5	-4,66
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,5	-1,41
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, рН 7,5	-1,53
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-НСl, PS20, рН 7,8	-0,87
F19	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 8,3	-1,09
F20	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 9,0	-2,18

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, исключены.

[00179] **Таблица 13:** Скорость образования размерных вариантов в выбранных составах EFX, хранимых при 2-8 °С, выраженная как потеря чистоты (как % уменьшения площади основного пика) по данным ОФ-ВЭЖХ в неделю.

Состав*	Композиция состава	Скорость образования размерных вариантов [%/месяц]
F33	20 мМ Трис-НСl, 120 мМ Arg/Arg-НСl, 120 мМ сахарозы, 0,06% масс./об. PS20, рН 7,3	-0,08
F18	20 мМ Трис/Трис-НСl, 160 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,8	-0,23
F3	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 220 мМ трегалозы, PS20, рН 5,0	-2,30
F14	20 мМ фосфата Na, 190 мМ сахарозы, 40 мМ Met, PS20, рН 7,5	-2,20
F15	20 мМ фосфата Na, 190 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НСl, PS20, рН 7,5	-2,20
F16	20 мМ фосфата Na, 180 мМ сахарозы, 40 мМ Glu, 40 мМ Arg, PS20, рН 7,5	-2,10
F17	180 мМ сахарозы, 40 мМ Arg/Arg-НСl, PS20, рН 7,8	-2,30

F19	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 8,3	-3,20
F20	20 мМ Трис/Трис-НСl, 220 мМ сахарозы, PS20, рН 9,0	-2,50

*Составы EFX, образующие гели или демонстрирующие разделение фаз, были исключены из анализа ОФ-ВЭЖХ.

Оценка массовых и зарядовых вариантов EFX в наиболее стабильных составах с помощью масс-спектрометрии

[00180] Для определения массовых вариантов и посттрансляционных модификаций, связанных с измененными зарядовыми вариантами, различные составы EFX характеризовали по интактной массе и пептидному картированию после расщепления трипсином. Для минимизации химических модификаций, таких как дезамидирование или окисление, возникающих при получении триптических пептидов, расщепление проводили в восстанавливающих условиях. Полученные триптические пептиды разделяли с помощью обращенно-фазовой ультраэффективной жидкостной хроматографии С18 (ОФ-УВЭЖХ) с выявлением УФ-поглощения (280 нм), а затем характеризовали с помощью масс-спектрофотометрического анализа высокого разрешения. Типы массовых вариантов EFX в не подвергнутых стрессу препаратах (храняемых замороженными) сравнивали с таковыми в препаратах, храняемых в течение 1 месяца при 2-8 °С, 1 месяца при 25 °С и 1 месяца при 40 °С (данные не показаны из-за сходства с 1 месяцем при 25 °С). Относительное содержание немодифицированного интактного гомодимера EFX и других массовых вариантов (фрагментов и модифицированных видов) в наиболее стабильных составах, F18 и F33, обобщено в таблице 14.

[00181] **Таблица 14:** Распределение массовых вариантов EFX по данным измерения ЖХ/МС в составах F18 и F33, храняемых в течение 1 месяца при 25 °С, по сравнению с такими же составами в условиях без стресса.

Массовые варианты EFX	Теория Интактная масса (Да)	Процентное содержание массовых вариантов EFX по данным МС				
		EFX F18 Без стресса	EFX F18 1 месяц при 25°С	EFX F33 Без стресса	EFX F33 1 месяц при 2- 8°С	EFX F33 1 месяц при 25°С
EFX (немодифицированный гомомер)	92 108,8	89,3	78,7	88,6	89,3	87,6
EFX, 6-424	91 496,10	1,7	1,0	1,9	1,0	1,8
EFX, 1-412	90 915,70	5,1	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
EFX, 1-411	90 816,50	0,6	3,6	4,7	4,7	4,8
EFX, 1-397	89 408,00	1,1	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
EFX, 1-396	89 336,90	0,3	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В

EFX, 1-377	87 376,50	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
EFX, 1-370	86 729,80	Н/В	0,4	0,8	0,9	0,9
EFX, 1-364	86 009,00	0,2	1,5	Н/В	Н/В	0,4
EFX, 1-298	78 704,70	Н/В	0,5	0,9	0,9	1,1
EFX, 1-296	78 463,40	0,1	Н/В	0,1	0,2	0,1
EFX, 1-278	76 679,60	0,2	Н/В	0,4	0,4	0,4
EFX, 1-276	76 437,30	Н/В	Н/В	0,5	0,5	0,6
EFX, 1-274	76 187,00	0,04	Н/В	0,5	0,5	0,6
EFX, 1-266	75 328,20	0,2	Н/В	0,1	Н/В	Н/В
EFX, 1-255	74 005,70	1,2	0,3	0,2	0,2	0,3
EFX (одиночный мономер)	46,054,40	0,4	Н/В	0,1	0,2	0,3
EFX+42 Да ⁽¹⁾	Н/П	0,8	Н/В	1,0	1,1	1,0
EFX+34 Да	Н/П	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
EFX+16 Да	Н/П	Н/В	14,0	Н/В	Н/В	Н/В

МС=масс-спектрометрия; Н/В=не выявлено

(1) Распространенная примесь +42 Да соответствует ацетилированию N-конца или основного остатка.

[00182] Для каждого триптического пептида идентифицировали типы посттрансляционных модификаций. Относительное содержание каждого пептида, содержащего модифицированный аминокислотный остаток, в наиболее стабильных составах EFX (F18 и F33) после стресса в течение 1 месяца при 25 °С сравнивали с такими же составами без стресса, смотрите таблицу 15.

[00183] **Таблица 15:** Анализ пептидной карты ЖХ/МС EFX из не подвергнутых и подвергнутых стрессу составов, F18 и F33.

Процент модифицированных пептидов						
Пептид	Тип	EFX F18	EFX F18	EFX F33	EFX F33	EFX F33
		Без стресса	1 месяц при 25 °С	Без стресса	1 месяц при 2-8 °С	1 месяц при 25 °С
ТА	Окисление	0,2	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
ТБ	Окисление	1,8	3,8	1,3	1,4	1,8
ТС	Сукцинимид	0,3	0,2	0,4	0,8	0,5
	Дезамидирование	0,8	0,7	Н/В	0,1	Н/В
ТD	Дезамидирование	0,7	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
ТE	Сукцинимид	Н/В	Н/В	0,3	0,2	0,2
	Дезамидирование	2,2	15,2	Н/В	Н/В	Н/В
ТF	Сукцинимид	3,4	3,2	2,6	2,7	2,5
	Дезамидирование	3,9	1,9	2,0	2,5	2,0

TG	Сукцинимид	0,3	Н/В	0,1	0,1	0,1
	Деаамирирование	0,8	0,3	Н/В	Н/В	Н/В
TH	Деаамирирование	0,8	0,5	Н/В	Н/В	Н/В
TI	Сукцинимид	3,0	2,6	2,3	2,0	1,8
	Деаамирирование	5,7	7,9	2,0	4,0	4,5
TJ	Сукцинимид	Н/В	0,3	Н/В	Н/В	Н/В
	Деаамирирование	0,5	2,1	1,2	3,0	4,6
TK	Деаамирирование	Н/В	0,4	Н/В	0,2	Н/В
TL	Окисление	0,7	2,1	0,4	0,4	1,1
TM	Сукцинимид	0,3	0,5	0,4	0,1	0,5
	Деаамирирование	2,0	0,4	0,3	0,1	0,5
TN	Деаамирирование	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
TO	Деаамирирование	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В	Н/В
TP	Деаамирирование	0,0	5,3	Н/В	Н/В	Н/В
TQ	Окисление	1,9	10,1	1,2	1,5	2,0

Н/В=не выявлено

[00184] Основной формой посттрансляционной модификации EFX, составленного в F18 и F33, является деаамирирование аспарагина (Asn) до кислых остатков аспарагиновой кислоты, включая низкие уровни сукцинимидного промежуточного продукта Asn, что приводит к более кислотным зарядовым вариантам. Восемь из девяти остатков Asn в каждой мономерной цепи EFX демонстрировали ту или иную степень деаамирирования. Кроме того, два из четырех остатков глутамина (Gln) также были деаамирированы до кислой глутаминовой кислоты в каждой мономерной цепи. Окисление метионина (Met) присутствовало на низких уровнях в трех позициях. Как и ожидалось, в наиболее стабильных составах EFX, F18 и F33, при стрессовых условиях наблюдается значительно более низкий уровень посттрансляционных модификаций и образования зарядовых вариантов, при этом F33 менее подвержен им, чем F18, особенно в отношении двух остатков Asn, наиболее подверженных деаамирированию, и Met, подверженного окислению (смотрите таблицу 15).

Оценка размерных вариантов EFX в наиболее стабильных составах с помощью эксклюзионной хроматографии - многоугольного рассеяния лазерного света (ЭХ-МРЛС)

[00185] Распределение видов по молекулярной массе в неразведенных образцах EFX оценивали с помощью ЭХ-МРЛС. Метод ЭХ-МРЛС позволяет отслеживать элюирование видов EFX разного размера с использованием двух последовательных детекторов: 1) УФ-детектора, регистрирующего на 280 нм и 360 нм (1260 Infinity LC, Agilent Technologies), и 2) детектора светорассеяния (DAWN HELEOS II, Wyatt Technology). Анализ данных и расчеты молекулярной массы (ММ) проводили по данным

МРЛС, используя программное обеспечение ASTRA 6 (Wyatt Technology). Для расчета значений молекулярной массы использовали теоретический коэффициент экстинкции $0,97 \text{ мл мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для EFX.

[00186] Анализ повторных инъекций составов EFX показал, что основной пик составлял 94,5% белка с кажущейся молекулярной массой 88,0-88,4 кДа, что хорошо согласуется с рассчитанной ММ 92 кДа. Также были обнаружены относительно небольшие количества трех дополнительных видов, включая два варианта с высокой ММ: димер и ВММ, и вариант с низкой ММ (НММ). На Фиг. 19 показана репрезентативная ЭХ-МРЛС-хроматограмма EFX в F18 (без стресса). Точное определение молекулярных масс малораспространенных вариантов было затруднено из-за относительно неполного разделения различных пиков из-за высокой концентрации белка, необходимой для ЭХ-МРЛС. Тем не менее, димерный вид имел кажущуюся ММ 136 кДа, а ВММ вид - кажущуюся ММ 292 кДа, что говорит о том, что ВММ вид может представлять собой более крупный олигомер, возможно, тетрамер. Количество НММ видов было недостаточным для определения ММ.

Распределение по размерам методом аналитического ультрацентрифугирования с определением скорости седиментации (СС-АУЦ) в наиболее стабильных составах

[00187] Гидродинамические конформационные свойства EFX в разных составах анализировали методом СС-АУЦ на аналитической ультрацентрифуге Optima (Beckman-Coulter). Образцы анализировали при концентрации 1,0 мг белка/мл. СС-АУЦ проводили при 20 °С с 12 мм двухсекторными ячейками для образцов с эпон-угольным центральным элементом в титановом роторе An50 с 8 отверстиями при 45000 об/мин. Глобальную аппроксимацию исходных краевых данных по седиментации, отобранных из подмножества измерений радиального сканирования, проводили для каждого образца с помощью анализа непрерывного распределения $c(s)$, используя программу SEDFIT V.11.71. Помимо получения профилей распределения коэффициента седиментации $c(s)$, оценивали коэффициенты седиментации в стандартных условиях ($S_{20,w}$), соотношение коэффициентов трения (f/f_0) и молекулярную массу (ММ).

[00188] Репрезентативные профили распределения коэффициента седиментации EFX в F18 и F33 приведены на Фиг. 20, где по вертикальной оси графика показано распределение концентрации, а по горизонтальной оси показано разделение видов на основе их коэффициента седиментации. Основной вид в составе F33, составляющий приблизительно 100% от общего количества видов, имеет кажущийся коэффициент седиментации 4,06 S, f/f_0 1,8 и рассчитанную кажущуюся ММ 89,7 кДа (таблица 16). Основной вид в составе F18, составляющий 98,7% от общего количества видов, имеет кажущийся коэффициент седиментации 4,47 S, f/f_0 1,6 и рассчитанную кажущуюся ММ 88,9 кДа (таблица 16). ВММ виды составляют от 0,2 до 1,3% от общего количества видов. В F18 не наблюдается ни одного НММ вида (Фиг. 23 с увеличенной вставкой). Значения коэффициента седиментации для ВММ видов соответствуют димеру ($\sim 6,5 \text{ S}$) и более крупному олигомерному виду, потенциально тетрамеру ($\sim 9 \text{ S}$).

[00189] **Таблица 16:** Гидродинамические параметры основного вида EFX в F18 и F33 по данным анализа СС-АУЦ.

Название образца	Анализ СС-АУЦ SEDFIT			
	Основной вид			
	f/f0	S _{20,w} (S)	Кажущаяся ММ (кДа)	Содержание (%)
EFX F18	1,6	4,47	88,9	98,7
EFX F33	1,8	4,06	89,7	100,0

f/f0=соотношение коэффициентов трения; ММ=молекулярная масса; S_{20,w}=коэффициент седиментации в стандартных условиях; СС-АУЦ=аналитическое ультрацентрифугирование с определением скорости седиментации

Клеточный биоанализ активности

[00190] В клеточном биоанализе активности EFX используют аналитические готовые клетки «iLite FGF21» (Svar Life Sciences, кат. № BM3071), полученные из линии клеток почка эмбриона человека, HEK293. Эти аналитические готовые клетки FGF21 были рекомбинантно сконструированы для сверхэкспрессии: (1) двух облигатных корецепторов человеческого FGF21: человеческий рецептор фактора роста фибробластов 1с (FGFR1c) и человеческий β Klotho (KLB), и (2) репортерной системы, сконструированной для экспрессии люциферазы светляков в ответ на последующую передачу внутриклеточного сигнала от активированного FGFR1c (Ogawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 7432-7437; Agrawal et al., Mol Metab. 2018;13:45-55; Yie et al., FEBS Lett. 583, 19-24). При связывании с виде корецепторного комплекса с KLB FGF21 активирует тирозинкиназу FGFR1c, которая в свою очередь фосфорилирует последующие адапторные белки в результате активации каскада саркома крыс - митоген-активируемая протеинкиназа (RAS-MAPK), включая фосфорилирование ERK1/2 (регулируемая внеклеточными сигналами протеинкиназа). Фосфорилированная ERK1/2 перемещается в ядро, где она активирует транскрипционный фактор, содержащий домен ETS белок Elk1 (Ornitz and Itoh, Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015;4(3):215-66; Zou et al, Mol Med Rep. 2019 Feb;19(2):759-770). Следовательно, аналитические готовые клетки iLite FGF21 делают возможным измерение in vitro активности EFX как агониста корецепторного комплекса FGF21, FGFR1c-KLB, в клеточном анализе. Тримерный комплекс EFX, одновременно связывающийся с корецепторами, стимулирует экспрессию фермента люциферазы пропорционально степени, в которой EFX активирует FGFR1c-опосредованную передачу сигнала.

[00191] Аналитические готовые клетки iLite FGF21 высевают, затем инкубируют с серийными разведениями тестируемых образцов EFX и соответствующими положительными и отрицательными контролями, исследуемыми параллельно. Для измерения количества экспрессируемой люциферазы клетки лизируют реагентом, содержащим детергент и субстрат люциферазы, люциферин. При расщеплении

люциферина люциферазой возникает люминесценция, которую измеряют, используя люминометр. Строят график зависимости сигнала люминесценции от концентрации белка тестируемого препарата с получением кривой «концентрация - ответ», которую аппроксимируют четырехпараметрическим логистическим уравнением с помощью нелинейного регрессионного анализа методом наименьших квадратов. Относительную активность тестируемых образцов определяют путем ограничения нижней/верхней асимптот и наклона Хилла значениями кривой, подогнанной к одновременно создаваемому графику концентрация - ответ эталонного стандарта, а затем получают отношение EC50 эталонного стандарта и параметра EC50 образца. Репрезентативная кривая концентрация - ответ для EFX в F18 приведена на Фиг. 21.

[00192] Относительная активность EFX в выбранных составах F1-F20 и F33, хранимых при 25 °С, измеренная в клеточном биоанализе i-Lite, проиллюстрирована на Фиг. 22. Относительная активность EFX в выбранных составах, хранимых при 2-8 °С, проиллюстрирована на Фиг. 23. При обоих условиях хранения составы EFX, содержащие буфер Трис-НСl, Arg/Arg-НСl, сахарозу, PS20 или PS80 (F33-F38), забуференные до диапазона рН от 7,0 до 7,6, не демонстрируют явную потерю активности с течением времени, в отличие от многих других составов, таких как F3, который демонстрировал приблизительно 80% потери активности после 12 недель хранения при 25 °С/60% ОВ.

[00193] Уникальная комбинация EFX с эксципиентами, входящими в состав F33, гарантировала, что клеточная активность EFX оставалась относительно неизменной с течением времени при хранении при 25 °С, в отличие от составов на основе других эксципиентов, обычно используемых для белковых биофармацевтических препаратов (Фиг. 22).

[00194] **Пример 4: Конформационная и термическая стабильность составов EFX**

[00195] Инфракрасные спектры с Фурье-преобразованием (FTIR) растворов, содержащих белок EFX, получали на FTIR-спектрометре Tensor 27 (Bruker Optics) и трансмиссионной оптической скамье AquaSpec при контролируемой температуре 25 °С. Спектры образцов белка, измеренные без разведения, регистрировали на волновых числах от 4000 до 850 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹. Каждое однолучевое измерение представляло собой среднее значение по 60 сканам с использованием атмосферной компенсации (устранение мешающих полос Н₂О и/или СО₂ в спектрах). Спектр поглощения каждого содержащего EFX образца с поправкой на фон преобразовывали во вторую производную спектра после векторной нормализации в области волновых чисел от 1700 до 1600 см⁻¹ и с 9 точками сглаживания.

[00196] Вторая производная FTIR-спектра EFX в F18 и F33 показана на Фиг. 24. В спектре поглощения наблюдаются сильные полосы на 1641 см⁻¹ и 1689 см⁻¹, соответствующие бета-складкам, что указывает на преобладание в белке антипараллельной бета-складчатой структуры, характерной для белков, содержащих Fc-домен.

Конформационная стабильность по данным спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ-диапазоне

[00197] Вторичную структуру EFX анализировали с помощью спектроскопии кругового дихроизма в дальнем УФ-диапазоне (КД). Первичным хромофором для спектроскопии в дальнем УФ-диапазоне (190-260 нм) являются пептидные связи белков. Сигнал КД, как функция длины волны, возникает из-за ориентации пептидных связей, лежащих в основе вторичной структуры, которая определяется последовательностью белка. Таким образом, КД-спектр в дальнем УФ-диапазоне обеспечивает чувствительное измерение вторичной структуры белков.

[00198] Для автоматизированных измерений КД-спектроскопии в дальнем УФ-диапазоне использовали спектрометр Chirascan Auto Q100 CD (Applied Photophysics Ltd.) (диапазон длин волн: 190-260 нм). Спектры получали при температуре 20 °С при концентрации белка 2,0 мг/мл и длине пути 0,1 мм. Ширина спектральной полосы была установлена на 1,0 нм, время измерения для одной точки составляло 1,0 с, а размер шага составлял 1,0 нм. Для каждого измерения образца белка усредняли по десять последовательных сканирований. Перед измерением каждого образца белка записывали эталонный спектр буфера для составления, который затем вычитали из спектра белка. После вычитания значения КД преобразовывали в значения средней эллиптичности на остаток ([Θ]mr).

[00199] КД-спектры EFX в дальнем УФ-диапазоне в составах F18 и F33 (195-260 нм) (Фиг. 25) соответствуют спектрам других белков, содержащих Fc-домен (Li et al, 2012). Спектр имеет небольшое плечо на 230 нм, указывающее на правильно свернутый Fc-домен. Первичная отрицательная эллиптичность КД-спектра характерна для белков суперсемейства фактора роста фибробластов, которое включает FGF21, что указывает на правильное сворачивание полипептидных цепей FGF21 в EFX (Xu et al, 2012). Однако следует отметить, что присутствие некоторых эксципиентов, таких как L-лизин и полисорбат 20, в некоторых составах, содержащих EFX, значительно увеличивает фоновое поглощение в дальнем УФ-диапазоне спектра, особенно на длинах волн ниже 195 нм. Поскольку это высокое фоновое поглощение необходимо вычитать из спектра каждого образца белка, полученная разность имеет плохое соотношение сигнал/шум и большую вариабельность в этой области длин волн ($\lambda < 195$ нм).

Конформационная стабильность по данным спектроскопии кругового дихроизма (КД) в ближнем УФ-диапазоне

[00200] Третичную структуру EFX оценивали с помощью КД в ближнем УФ-диапазоне. Сигналы на КД-спектрах в ближнем УФ-диапазоне связаны с ароматическими аминокислотами и с дисульфидными связями, находящимися в асимметрическом конформационном окружении, присутствующими только тогда, когда белок свернут в четкую 3-мерную структуру.

[00201] КД-спектральные измерения в ближнем УФ-диапазоне (250-350 нм) проводили на спектрометре Chirascan Auto Q100 CD (Applied Photophysics Ltd.). Спектры

получали при температуре 20 °С при концентрации белка 2,0 мг/мл и длине пути 5,0 мм. Ширина спектральной полосы была установлена на 1,0 нм, время измерения для одной точки составляло 1,0 с, а размер шага составлял 1,0 нм. Для каждого измерения образца белка усредняли по десять последовательных сканирований. Перед измерением образца белка записывали эталонный спектр буфера для составления и вычитали его из спектра образца. После вычитания значения КД преобразовывали в значения средней эллиптичности на остаток ($[\Theta]_{\text{nr}}$).

[00202] КД-спектры в ближнем УФ-диапазоне для EFX в составах F18 и F33 показана на Фиг. 26. Спектры содержат значительные сигналы на 289-292 нм, относящиеся к остаткам триптофана, на 270-285 нм, соответствующие остаткам тирозина, и на 250-270 нм, относящиеся к остаткам фенилаланина и тирозина, наложенные на широкий дисульфидный сигнал на 250-270 нм. Интенсивность этих элементов отражает уникальное структурное расположение дисульфидных связей и ароматических аминокислот в свернутой структуре EFX. Например, если бы образцы EFX были полностью развернуты, спектр представлял бы собой прямую линию в районе нуля, тогда как частично развернутый белок демонстрировал бы сниженную интенсивность различных спектральных сигналов, в частности в области 250-270 нм, связанную с пространственным расположением дисульфидных связей. Форма и интенсивность КД-спектра в ближнем УФ-диапазоне указывают на то, что EFX свернут в четко определенную третичную структуру.

Термическая стабильность по данным дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (мкДСК)

[00203] Термическую стабильность EFX оценивали методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (мкДСК), используя систему MicroCal Auto VP-Capillary DSC (Malvern). Термограммы получали, используя концентрацию белка 2,0 мг/мл. Чтобы охарактеризовать эндотермы, связанные с разворачиванием EFX, образцы составов, содержащих EFX или эксципиенты и буфер без EFX, нагревали от 10 до 110 °С со скоростью 60 °С/ч. Для предотвращения кипения образцов при нагревании до высокой температуры в ячейку мкДСК держали под давлением. Исходное измерение проводили путем загрузки ячеек как для эталона, так и для образца буфером для составления. Исходную термограмму вычитали из каждого измерения состава, содержащего EFX. Затем значение избыточной теплоемкости для образца нормализовали относительно концентрации белка. Значения средней температуры термического перехода (T_m) определяли в центре пиков или плеч, используя анализа производных термосканирования. Для определения значения параметров термической стабильности анализ данных и деконволюцию пиков проводили с помощью программного обеспечения для ДСК Origin 7.0.

[00204] Репрезентативные термограммы для EFX в F18 и F33 показана на Фиг. 27. Они позволили выявить три дискретных эндотермических пика с соответствующими значениями T_m приблизительно 33,8-38,8, 62,7-65,1 и 81,1-81,7 °С (таблица 17). Пик на 65

°C включает заметное левое плечо, что указывает на наличие двух событий термического разворачивания, однако эти два пика не удалось разрешить с помощью подходов деконволюции. Первая эндотерма на 38,8 °C, соответствующая разворачиванию доменов FGF21, является полностью обратимой. На Фиг. 28 показана исходная термограмма EFX при нагревании до 50 °C, наложенная на вторую термограмму, полученную после охлаждения до 10 °C, а затем повторного нагревания до 50 °C. Наложение термограмм этих двух последовательных термических плавлений подтверждает, что первое разворачивание ($T_{m1}=38,8$ °C) является полностью обратимым.

[00205] **Таблица 17:** Результаты измерений мкДСК для EFX F18 и F33.

Образец	Результаты мкДСК			
	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	T_{m3} [°C]	ΔH [ккал/моль]
F18	38,8	65,1	81,1	412
F33	33,8	62,7	81,7	408

T_m =средняя температура термического перехода. ΔH =изменение энтальпии.

[00206] Метод мкДСК продемонстрировал начало разворачивания приблизительно при 28 °C, что говорит о конформационной нестабильности EFX. При разворачивании белка аминокислотные остатки могут стать более открытыми на внешней поверхности, что может привести к дезамидированию Asp и Gln и окислению Met, тогда как открытие более гидрофобных аминокислот может вызвать агрегацию белка. Составы, содержащие Arg/Arg-HCl, Glu и Lys, улучшают конформационную стабильность EFX, снижая тем самым физическую деградацию, агрегацию и образование зарядовых вариантов. Составы, содержащие сахарозу, обладают лучшими вязкоупругими свойствами, конформационной и термической стабильностью, чем составы, содержащие трегалозу.

[00207] **Пример 5: Способ лиофилизации**

[00208] В этом примере описана разработка состава, который является стабильным при комнатной температуре и позволяет пациентам самостоятельно вводить EFX. Одиннадцать составов EFX, включая F2, F3, F7, F9, F12, F14, F15, F16, F17, F18 и F33, лиофилизировали во флаконах и двухкамерных устройствах. Оценивали различные схемы/циклы (параметры) способа лиофилизации с целью улучшения/оптимизации надежности способа, соответствия критических атрибутов качества (CQA) и долгосрочной стабильности при комнатной температуре. Чтобы гарантировать удобный самостоятельный прием пациентами, измеряли время восстановления лиофила для различных составов и параметров способа лиофилизации.

Описание способа лиофилизации

[00209] Способ/цикл лиофилизации посредством сухой заморозки варьировали для оценки эффекта этапов и рабочих параметров способа на CQA, включая время восстановления, внешний вид лиофилизированной таблетки, количество невидимых невооруженным глазом частиц после восстановления и стабильность при длительном

хранении.

Начальный способ/цикл лиофилизации

[00210] Пример способа лиофилизации для флаконов без этапа отжига показан на Фиг. 29. Полки сублимационной сушилки предварительно охлаждают при температуре 5 °С, после чего проводят начальный цикл заморозки при температуре -45 °С. Затем проводят первичную сушку при температуре полок -25 °С и давлении в камере 0,08 мбар. Во время первичной сушки на продукт подают тепло, чтобы превратить фазово-разделенный лед непосредственно в водяной пар путем сублимации. Конец первичной сушки (обозначен стрелкой на Фиг. 29) определяется как момент, когда датчик емкости и вакуумный датчик Пирани выровнены, а температура продукта стабилизирована выше температуры полки. Хотя первичная сушка удаляет кристаллы льда путем сублимации, вторичная сушка необходима для удаления связанной с EFX воды путем диффузии. Хотя вторичная сушка в определенной степени происходит во время сублимации, скорость десорбции воды при низкой температуре полки (типичной для первичной сушки) является низкой. При повышении температуры полки до 40 °С во время последующего цикла вторичной сушки адсорбированная вода полностью удаляется через 10 часов.

Разработка способа лиофилизации

[00211] Были изучены вариации способа лиофилизации. В частности, первоначальный цикл заморозки был адаптирован для включения этапа отжига, при котором температуру полки циклически повышают и понижают в течение цикла заморозки. Отжиг служит двум разным целям, в зависимости от состава рецептуры: а) он позволяет выращивать кристаллы для фазово-разделенных, кристаллизующихся эксципиентов и б) он увеличивает размер кристаллов льда за счет Освальдовского созревания, что приводит к увеличению размеров пор, тем самым увеличивая скорость сублимации во время первичной сушки. Этапы отжига в данном исследовании включали отжиг при -10 °С в течение 5 ч (Фиг. 33), отжиг при -7 °С или -5 °С в течение 10 ч (не показано). По завершении отжига полки охлаждали до -45 °С и продолжали процесс лиофилизации с этапом первичной сушки при -25 °С (Фиг. 30).

Влияние включения цикла отжига в процесс сухой заморозки на время восстановления лиофилизованного EFX

[00212] Лيوфилизированные сухие порошковые таблетки составов, содержащих EFX, восстанавливали водой для инъекций и составленным разбавителем на основе состава F33. Для удобства применения пациентами время восстановления в идеале должно составлять 5 минут или менее (хотя в контексте изобретения это не обязательно).

[00213] Чтобы учесть разное содержание сухого вещества в составах, проводили гравиметрическое определение потери воды во время лиофилизации. Для этого 10 флаконов каждого состава взвешивали до и после лиофилизации и рассчитывали потерю воды. Затем определенный объем воды для инъекций использовали для восстановления сухих порошковых таблеток. Воду добавляли в центр крышки контейнера (флакона или двухкамерного устройства, ДКУ), используя пипетку. Крышку контейнера осторожно

закручивали (избегая встряхивания). Регистрировали время, необходимое для полного восстановления лиофилизированной таблетки (часы: минуты: секунды или минуты: секунды).

[00214] После завершения процесса сухой заморозки без этапа отжига (Фиг. 29) регистрировали время восстановления для десяти лиофилизированных составов, соответствующих 100 мг/мл EFX, включая F2, F3, F7, F9, F12, F14, F15, F16, F17 и F18, смотрите Фиг. 31.

[00215] Измеренные времена восстановления десяти выбранных составов широко варьировались в диапазоне от 1 часа: 20 мин: 58 секунд для F2 до 7 мин: 55 секунд для F16, что указывает на зависимость от композиции и pH составов. Примечательно, что время восстановления было значительно больше в составах типа F2, в которых EFX предрасположен к образованию структурированных гелевых решеток с течением времени. Такие составы характеризуются высокой вязкостью (Фиг. 4) и неьютоновским поведением (Фиг. 5). Более длительное время восстановления также наблюдали в составах, приготовленных при pH ниже изоэлектрической точки EFX.

[00216] Включение этапа отжига в процесс лиофилизации (Фиг. 30) значительно улучшило структуру лиофилизированной таблетки за счет уменьшения удельной поверхности (менее плотная таблетка) и максимизации площади пор (Фиг. 37), а также ускорило восстановление приблизительно на 50% для заданного состава, например F33, во флаконах (Фиг. 32) и двухкамерных устройствах (Фиг. 33).

Удельная площадь поверхности (БЭТ)

[00217] Влияние этапа отжига на структуру лиофилизированной таблетки оценивали с помощью БЭТ-анализа удельной площади поверхности. Удельная площадь поверхности выбранных лиофилизированных составов анализировали методом БЭТ (теория Брунауэра, Эмметта и Теллера), используя прибор Autosorb-1 (Quantachrome Instruments). Метод БЭТ является наиболее широко используемой процедурой определения площади поверхности твердых материалов, в которой используется следующее уравнение:

$$\frac{1}{W \left(\left(\frac{p}{p_0} \right) - 1 \right)} = \frac{1}{Wm * C} + \frac{C - 1}{Wm * C} \left(\frac{p}{p_0} \right)$$

W : масса газа, адсорбированного при относительном давлении (p/p_0) [г];

p : парциальное давление пара [Па] адсорбированного газа в равновесии с поверхностью при 77,3 Кельвинах,

p_0 : насыщенное давление [Па] адсорбированного газа

Wm : масса адсорбата, образующего монослой, покрывающий поверхность [г]

C : константа БЭТ, связанная с энергией адсорбции первого адсорбированного слоя

[00218] Для уравнения БЭТ необходима линейная зависимость $1/[W(p_0/p)-1]$ от p/p_0 , что для большинства твердых тел ограничено определенной областью адсорбционной изотермы, обычно в диапазоне p/p_0 от 0,05 до 0,35. Для стандартной

многоточечной процедуры БЭТ необходимо наличие как минимум трех точек в соответствующем диапазоне относительного давления.

[00219] Массу (Wm) монослоя можно получить из наклона (s) и пересечения (i) графика БЭТ:

$$Wm = \frac{1}{s + i}$$

[00220] Вторым шагом в применении метода БЭТ является расчет площади поверхности. Для этого необходимо знать площадь молекулярного поперечного сечения (Acs) молекулы адсорбата. Общую площадь поверхности (St) образца можно выразить как:

$$St = \frac{Wm * N * Acs}{M}$$

N : число Авогадро ($6,0221415 \times 10^{23}$ молекул/моль)

M : Молекулярная масса адсорбата [г/моль]

[00221] Удельную площадь поверхности (S) [m^2/g] твердого вещества можно рассчитать из общей площади поверхности ($St [m^2]$) и массы образца ($w [g]$):

$$S = St/w$$

Подготовка и анализ образцов

[00222] Приблизительно 100 мг лиофилизированного продукта тщательно измельчали шпателем на мелкие кусочки и переносили в измерительный сосуд. Перед измерением площади адсорбции криптона необходимо удалить с поверхности образца весь адсорбированный из окружающей среды газ. Измерительный сосуд присоединяли к станции дегазации и включали вакуум. Вакуум прекращали после 16 часов дегазации при комнатной температуре.

[00223] Затем измерительные сосуды (ячейки) заполняли на около 5 секунд гелием (0,7-1,0 бар). Адсорбцию криптона измеряли при температуре бани $-195,8$ °C (77,3 К). Было получено семь точек данных, охватывающих область p/p_0 от 0,05 до 0,35. Строили зависимость $1/[W*(p_0/p)-1]$ от p/p_0 .

[00224] Удельная площадь поверхности (БЭТ) лиофилизированной таблетки, полученной из состава F33 с и без включения этапов отжига в процесс сушки заморозкой, представлена на Фиг. 34. Числовые значения удельной площади поверхности были на 50% и 75% ниже, соответственно, для таблеток, полученных с использованием этапа отжига при -5 °C в течение 10 часов (технологическая схема A1) или -10 °C в течение 5 часов (технологическая схема A2), по сравнению с таблетками, полученными без этапа отжига во время процесса сухой заморозки (технологическая схема NA), смотрите Фиг. 34. Данные демонстрируют, что включение этапа отжига в процесс сухой заморозки значительно уменьшает удельную площадь поверхности получаемой таблетки (менее плотные таблетки), что связано со значительно меньшим временем восстановления, как, например, для F33 (Фиг. 33А и 33В).

Оценка морфологии и структуры лиофилизированных таблеток с помощью сканирующей электронной микроскопии с энергодисперсионной рентгеновской

спектроскопией (СЭМ-ЭДР)

[00225] Морфологию лиофилизированного состава, содержащего EFX, анализировали методом СЭМ-ЭДР, используя систему JSM-IT 200 (Jeol). Подготовку образцов проводили в перчаточном боксе при контролируемой влажности ($\leq 10\%$ о.в.). Подсчитывали количество пор в лиофилизированной таблетке, а также площадь пор, используя сигнал детектора вторичных электронов (ДВЭ). Напряжение заземления и зондовый ток были установлены на 5 кВ и 20%, соответственно. Все измерения проводили в условиях неконтролируемого высокого вакуума после 20 минут уравнивания. Регулировали яркость и контрастность для достижения высокой контрастности получаемых изображений. Нумерацию пор и количественное определение площади пор проводили, используя программное обеспечение для анализа частиц Jeol V3. Для идентификации пор применяли двухуровневую бинаризацию (преобразование многотонного изображения в черно-белое) на основании значения яркости полученных изображений (которое настраивали для каждого образца). Поры площадью менее 20 мкм² были исключены из анализа.

[00226] СЭМ-анализ также проводили с помощью настольного сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Phenom (Phenom-World B.V.). Этот прибор был оснащен CCD-камерой и мембранным вакуумным насосом. Освещенность образца, а также разрешение сферических частиц эталонного образца были подтверждены.

[00227] Для восстановления лиофилизированной таблетки содержащие таблетки стеклянные флаконы горизонтально разрезали посередине, используя Micromot 50/E, оснащенный алмазным шлифовальным кругом Proххон. Горизонтальные и вертикальные срезы лиофилизированной таблетки получали, используя бритвенное лезвие, как показано на Фиг. 35.

[00228] Срезы помещали на углеродный проводящий цемент на держателе образцов, представляя срез поперечного сечения как верхнюю поверхность, как указано в таблице 18.

[00229] **Таблица 18:** Обзор срезов лиофилизированной таблетки, проанализированных методом СЭМ-ЭДР.

Номер среза	Описание
I	Верхняя часть лиофилизированной таблетки
II	Горизонтальный срез
III	Вертикальный срез
IV	Нижняя часть лиофилизированной таблетки

[00230] Таблетки из сухого порошка EFX анализировали в вакууме при световом оптическом увеличении 20 x и ускоряющем напряжении 5 кВ. Электронно-оптическое

увеличение регулировали в диапазоне от 340х до 10000х, при этом получали изображения репрезентативных срезов каждого образца. Наименьшее увеличение зависело от высоты образца и его расположения в СЭМ.

[00231] На Фиг. 36 приведены графики размаха для распределения площади пор поперечных сечений лиофилизированных таблеток, полученных из состава F33 с или без этапа отжига в процессе сухой заморозки, и проанализированных методом СЭМ-ЭДР. Более широкое распределение по площади пор очевидно в таблетках, полученных путем сухой заморозки с этапом отжига, по сравнению с процессом без этапа отжига.

[00232] В соответствии с этим, СЭМ-изображения на Фиг. 37 показывают, что включение этапа отжига в процесс лиофилизации значительно улучшает структуру и морфологию сухой порошковой таблетки за счет снижения удельной площади поверхности (менее плотные таблетки) и максимизации площади пор, что облегчает технологические этапы первичной и вторичной сушки и улучшает время восстановления.

[00233] **Пример 6: Долгосрочная стабильность лиофилизированных составов EFX, хранимых в стрессовых условиях**

[00234] Отбирали лиофилизированные составы в диапазоне pH 7,3-7,8 (F15, F16, F17 и F33) и хранили в условиях комнатной температуры (25 °C/60% относительной влажности). Чтобы оценить стабильность после хранения в течение до 12 месяцев, составы оценивали с помощью панели тестов, применяемых для КК при выпуске лекарственного продукта EFX. На Фиг. 38 обобщены данные тестов по долгосрочной стабильности лиофилизированного EFX при 25 °C в составах F15, F16, F17 и F33.

[00235] При сравнении зарядовых вариантов, размерных вариантов (агрегация, усечение/фрагментация), образования невидимых невооруженным глазом частиц по СИФ и клеточной активности EFX во всех 4 составах в нулевой момент времени, через три месяца, шесть месяцев (не показано), девять месяцев и 14 месяцев, данные продемонстрировали практически полное отсутствие изменений или минимальные изменения, с учетом вариабельности методов, в числовых значениях критических характеристик продукта с течением времени для лиофилизированных составов, включая F33, в этом диапазоне pH.

[00236] Способ лиофилизации, включающий этап отжига в цикле заморозки, не только повышал эффективность процесса, но и обеспечивал соответствующие характеристики продукта, долгосрочную стабильность в различных условиях, включая комнатную температуру, а также быстрое восстановление, обеспечивающее возможность самостоятельного введения пациентами.

[00237] Эти наблюдения применимы не только к EFX, лиофилизированному в наиболее стабильном составе F33, но и к другим составам, которые ранее демонстрировали значительную скорость образования зарядовых вариантов, размерных вариантов (ВММ и НММ) и невидимых невооруженным глазом частиц при хранении в жидком виде в условиях охлаждения и комнатной температуры.

[00238] **Пример 7: Сывороточные концентрации EFX**

[00239] Изучали фармакокинетические параметры различных составов *in vivo*. Каждое животное в группах 1-7 получало одну подкожную (п/к) дозу (объемом 5 мл/кг) соответствующего тестируемого состава, содержащего EFX. Подробные данные о составах EFX, вводимых каждой группе, приведены в таблице 19. Каждая группа содержала по девять самок, а доза, вводимая каждому субъекту, составляла 100 мг/кг.

Таблица 19: Составы, используемые в исследовании

Группа	Состав	Вязкость (сП при 20°C)
1	20 мМ Трис-НСl, 120 мМ сахарозы, 120 мМ аргинина/аргинина-НСl, 0,06% масс./об. полисорбата 20, рН 7,3 ± 0,3 в стерильной воде для инъекций.	1,9
2	20 мМ глутамата Na/глутаминовой кислоты, 200 мМ трегалозы, 40 мМ Lys-НСl, 0,04% масс./об. полисорбата 20 (начиная с 0,008% масс./об.), рН 5,5 (F4)	9920
3	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20 (начиная с 0,008% масс./об.), рН 5,5 (F7)	9279
4	20 мМ сукцината Na/янтарной кислоты, 220 мМ сахарозы, 0,04% полисорбата 20 (начиная с 0,008% масс./об.), рН 5,5 (F9)	3878
5	20 мМ гистидина, 220 мМ трегалозы, 0,04% полисорбата 20 (начиная с 0,008% масс./об.), рН 6,0 (F11)	> верхнего инструментального предела
6	20 мМ Трис-НСl, 80 мМ Arg/Arg-НСl, 80 мМ сахарозы, 0,5% Na-СМС, 0,06% масс./об. полисорбата 20, рН 7,3	5,06
7	20 мМ Трис-НСl, 80 мМ Arg/Arg-НСl, 80 мМ сахарозы, 0,5% ПЭГ-4000, 0,06% масс./об. полисорбата 20, рН 7,3	1,94

[00240] Концентрация EFX в различные моменты времени после введения проиллюстрирована на Фиг. 39. На Фиг. 40 приведены обобщенные фармакокинетические параметры, показательные для общего системного воздействия (ППК), что позволяет судить о биодоступности, а также для максимальной концентрации в системной циркуляции (Смакс). Удивительно, но ПЭГ (а именно ПЭГ 4000) повышал системное воздействие/биодоступность после подкожной инъекции, несмотря на то, что не был ковалентно конъюгирован с EFX.

[00241] Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров для ясности понимания, специалистам в данной области техники в свете идей этого изобретения будет

легко понять, что в него можно вносить определенные изменения и модификации, не отступая от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:
 - (1) эфруксифермин (EFX);
 - (2) сахар;
 - (3) от около 20 до около 200 мМ аргинина/аргинина-НСl или аргинина/глутаминовой кислоты; и
 - (4) поверхностно-активное вещество;при этом композиция имеет рН от около 6,9 до около 8,1.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что концентрация EFX составляет от около 25 до около 150 мг/мл.
3. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что концентрация EFX составляет около 28 мг/мл.
4. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что концентрация EFX составляет около 50 мг/мл.
5. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что концентрация EFX составляет около 70 мг/мл.
6. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что концентрация EFX составляет около 100 мг/мл.
7. Композиция по любому из пп. 1-6, содержащая аргинин/аргинин-НСl.
8. Композиция по п. 7, содержащая от около 20 мМ до около 200 мМ аргинина/аргинина-НСl.
9. Композиция по п. 8, содержащая около 120 мМ аргинина/аргинина-НСl.
10. Композиция по любому из пп. 1-9, содержащая аргинин/аргинин-НСl в соотношении от около 1:30 аргинина/аргинина-НСl до около 1:50 аргинина/аргинина-НСl.
11. Композиция по любому из пп. 1-6, содержащая аргинин/глутаминовую кислоту.
12. Композиция по п. 11, содержащая от около 20 мМ до около 200 мМ аргинина/глутаминовой кислоты.
13. Композиция по любому из пп. 1-12, дополнительно содержащая Трис-НСl, фосфат натрия, сукцинат натрия/янтарную кислоту, глутамат натрия/глутаминовую кислоту, ацетат натрия/уксусную кислоту, глицилглицин/глицилглицин-НСl, гистидиновый или цитратный буфер.
14. Композиция по п. 13, содержащая Трис-НСl в концентрации от около 10 мМ до около 50 мМ.
15. Композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что сахар представляет собой сахарозу.
16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что концентрация сахарозы составляет от около 50 до около 220 мМ.
17. Композиция по п. 15 или 16, отличающаяся тем, что концентрация сахарозы составляет около 120 мМ.
18. Композиция по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что сахар представляет

собой глюкозу, фруктозу или мальтозу.

19. Композиция по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-20 или полисорбат-80.

20. Композиция по п. 19, отличающаяся тем, что концентрация поверхностно-активного вещества составляет от около 0,004% до около 0,1% масс./об.

21. Композиция по любому из пп. 1-20, отличающаяся тем, что имеет рН 7,3.

22. Композиция по любому из пп. 1-21, отличающаяся тем, что имеет вязкость ≤ 5 сП при комнатной температуре.

23. Композиция по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что является стабильной при температуре около 2-8 °С в течение по меньшей мере 21 месяца в виде жидкости.

24. Композиция по п. 1 содержащая:

(1) около 25-150 мг/мл эфруксифермина (EFX);

(2) около 120 мМ сахарозы;

(3) около 120 мМ аргинина/аргинина-НСl;

(4) около 0,06% по массе/объему (масс./об.) полисорбата-20; и

(5) около 20 мМ Трис-НСl;

при этом композиция имеет рН около 7,3.

25. Композиция по любому из пп. 1-24, которая представляет собой жидкую композицию.

26. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что представляет собой гелевый состав, а сахар представляет собой трегалозу.

27. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что концентрация трегалозы составляет от около 180 до около 220 мМ.

28. Композиция по п. 26 или 27, отличающаяся тем, что концентрация трегалозы составляет около 220 мМ.

29. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит не более чем около 40% видов зарядовых вариантов EFX при хранении в диапазоне температур от -30 °С до -20 °С в течение до 24 месяцев.

30. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов EFX при хранении при около 2-8 °С в течение до 9 месяцев.

31. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит не более чем около 40% кислотных видов зарядовых вариантов EFX при хранении при около 25 °С в течение до 4 недель.

32. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит не более чем около 20% видов размерных вариантов EFX при около 25 °С в течение до 4 недель.

33. Композиция по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что содержит не более чем около 10% видов размерных вариантов EFX при хранении при около 2-8 °С в течение до 14 месяцев.

34. Композиция по п. 25, которая представляет собой восстановленную лиофилизированную композицию.

35. Композиция по любому из пп. 1-24, которая представляет собой лиофилизированную композицию.

36. Композиция по п. 35, имеющая остаточное содержание влаги около 1% или менее.

37. Композиция по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что дополнительно содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ).

38. Композиция по п. 37, отличающаяся тем, что ПЭГ представляет собой ПЭГ-4000.

39. Композиция по п. 38, отличающаяся тем, что ПЭГ-4000 присутствует в концентрации от около 0,05% до около 5%, необязательно от около 0,15% до около 1,5%.

40. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что ПЭГ-4000 присутствует в концентрации около 0,5%.

41. Композиция по любому из пп. 1-40, отличающаяся тем, что дополнительно содержит карбоксиметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу.

42. Композиция по п. 41, отличающаяся тем, что (i) карбоксиметилцеллюлоза представляет собой карбоксиметилцеллюлозу натрия или (ii) гидроксипропилметилцеллюлоза представляет собой гидроксипропилметилцеллюлозу натрия.

43. Композиция по п. 42, отличающаяся тем, что карбоксиметилцеллюлоза натрия присутствует в концентрации от около 0,05% до около 5%, необязательно от около 0,15% до около 1,5%.

44. Композиция по п. 43, отличающаяся тем, что карбоксиметилцеллюлоза натрия присутствует в концентрации около 0,5%.

45. Композиция по любому из пп. 25-31, содержащая около 80 мМ аргинина/глутаминовой кислоты и около 80 мМ сахарозы.

46. Способ, включающий (а) восстановление композиции по п. 35 или 36 в течение около пяти минут для получения восстановленной композиции и (б) введение восстановленной композиции субъекту.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что восстановленную композицию этапа (а) поддерживают при комнатной температуре в течение до 10 минут перед этапом (б).

48. Способ по п. 46 или 47, отличающийся тем, что этап (б) включает подкожное введение восстановленной композиции субъекту.

49. Двухкамерное устройство, содержащее композицию по п. 35 или 36 и разбавитель.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(1) эфруксифермин (EFX);

(2) 2,9% L-лизина;

(3) 0,008% по массе/объему (масс./об.) полисорбата-20; и

(4) 10 мМ Трис;

при этом композиция имеет рН $7,8 \pm 0,3$.

51. Способ получения лиофилизированной композиции, включающий:

(а) заморозку композиции по любому из пп. 1-25;

(b) отжиг композиции этапа (а) при температуре от около -5°C до около -20°C ; (с) первичную сушку продукта этапа (b); и

(d) вторичную сушку продукта этапа (с).

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что заморозку на этапе (а) проводят при температуре от около -40°C до около -50°C .

53. Способ по п. 51 или 52, отличающийся тем, что отжиг на этапе (b) проводят в течение от около 5 до около 20 часов.

54. Способ по любому из пп. 51-53, отличающийся тем, что отжиг на этапе (b) проводят при температуре от около -5°C до около -10°C .

55. Способ по любому из пп. 51-53, отличающийся тем, что первичную сушку на этапе (с) проводят при давлении в камере от около 0,08 до 0,2 мбар.

56. Способ по любому из пп. 51-54, отличающийся тем, что первичную сушку на этапе (с) проводят при температуре от около -5°C до -30°C .

57. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

58. Способ реверсии НАСГ с циррозом, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

59. Способ лечения алкогольного стеатогепатита (АСГ), алкогольной болезни печени (АБП) или алкогольной жировой болезни печени (АЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

60. Способ нормализации содержания жира в печени нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что содержание жира уменьшается до $< 5\%$ содержания жира в печени.

62. Способ реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

63. Способ лечения диабета 2 типа, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

64. Способ лечения ожирения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

65. Способ лечения дислипидемии, включающий введение нуждающемуся в этом

субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

66. Способ снижения уровня глюкозы в крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

67. Способ повышения чувствительности к инсулину, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

68. Способ снижения уровней мочевой кислоты, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

69. Способ лечения пристрастия или зависимости, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

70. Способ лечения заболевания, вызываемого неправильным сворачиванием белка, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 1-36 или 50.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что заболевание, вызываемое неправильным сворачиванием белка, представляет собой муковисцидоз, дефицит альфа-1-антитрипсина или транстретиновую амилоидную кардиомиопатию.

72. Способ по п. 70 или 71, дополнительно включающий введение молекулы-корректора неправильно свернутого белка.

73. Способ лечения неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

74. Способ реверсии НАСГ с циррозом, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

75. Способ лечения алкогольного стеатогепатита (АСГ), алкогольной болезни печени (АБП) или алкогольной жировой болезни печени (АЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

76. Способ нормализации содержания жира в печени нуждающегося в этом субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

77. Способ реверсии цирроза печени или уменьшения фиброза, связанного с НАСГ, АСГ, АБП, АЖБП или заболеванием, вызываемым неправильным сворачиванием белка, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

78. Способ лечения диабета 2 типа, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

79. Способ лечения ожирения, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

80. Способ лечения дислипидемии, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

81. Способ снижения уровня глюкозы в крови, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

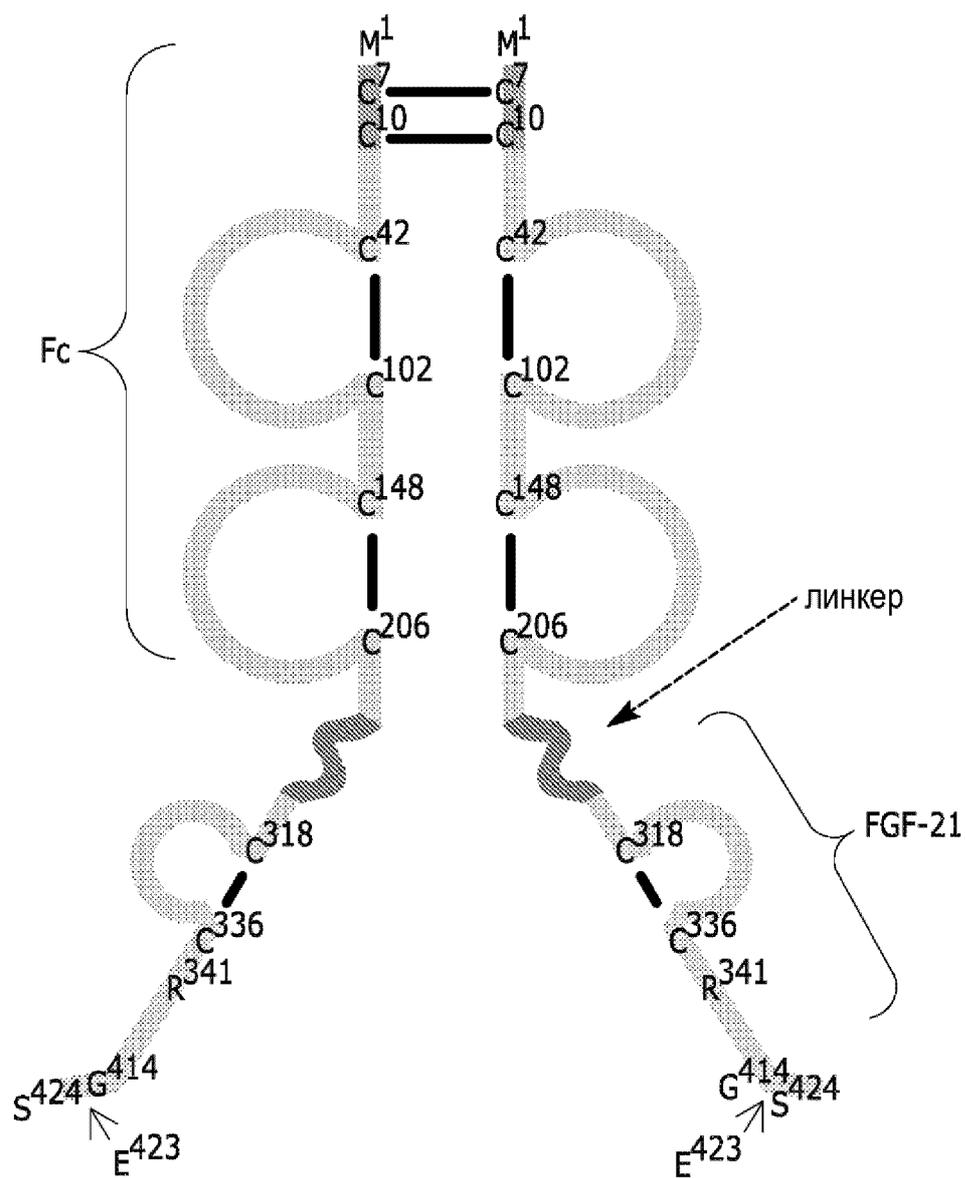
82. Способ повышения чувствительности к инсулину, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

83. Способ снижения уровней мочевой кислоты, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

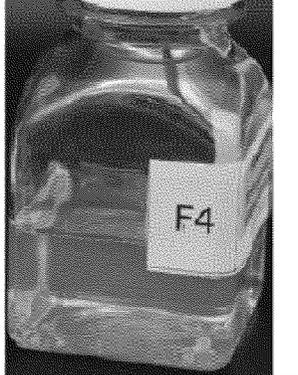
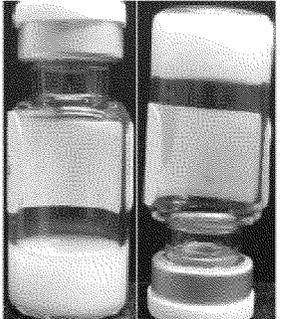
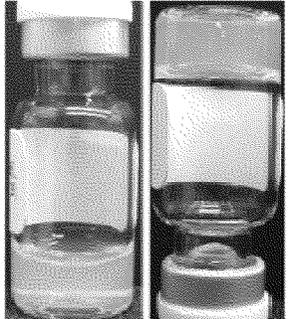
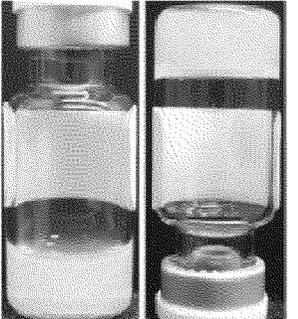
84. Способ лечения пристрастия или зависимости, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

85. Способ лечения заболевания, вызываемого неправильным сворачиванием белка, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 37-45.

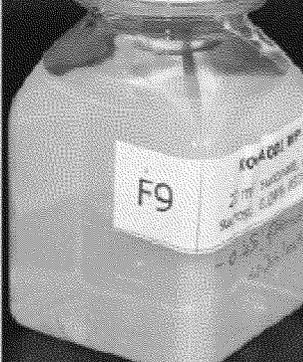
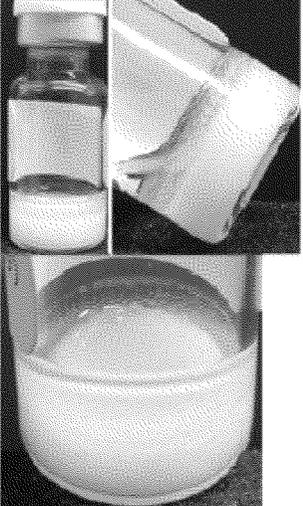
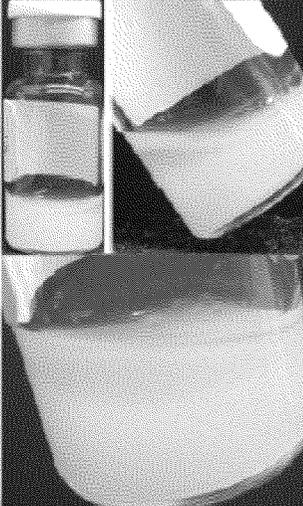
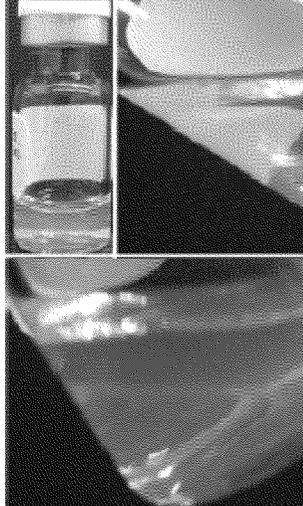
По доверенности



Фиг. 1

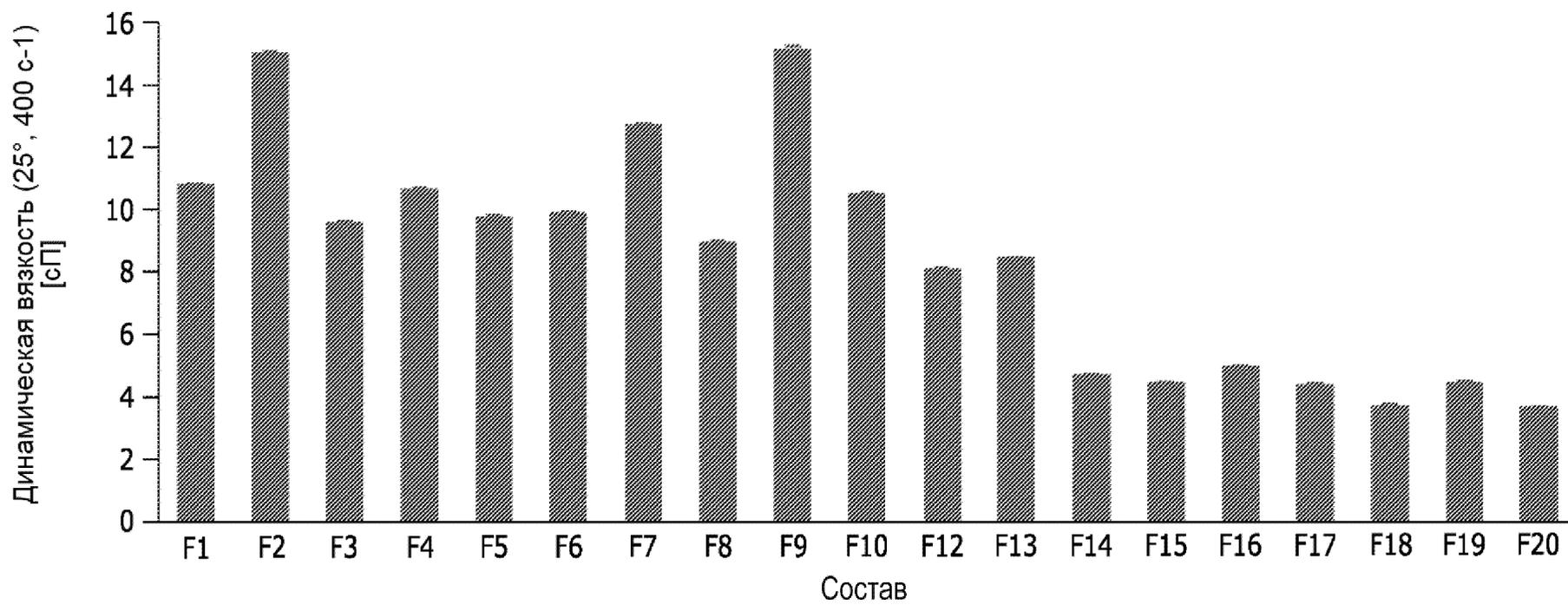
Момент времени	F1	F2	F4	F7
До подачи				
	Оценка 0/прозрачный	Оценка 0/Мутный (высокой степени) (после 0,45 мкм фильтра)	Оценка 0/Мутный (средней степени)	Оценка 0/Мутный (высокой степени)
T3d_40C				

Фиг. 2А

Момент времени	F8	F9	F12
До подачи (12-ое июля 19)			
	Оценка 0/Мутный (высокой степени) (после 0,45 мкм фильтра)	Оценка 0/Мутный (высокой степени) (после 0,45 мкм фильтра)	Оценка 0/Мутный (средней степени, рассеянный свет)
T3d_40C			

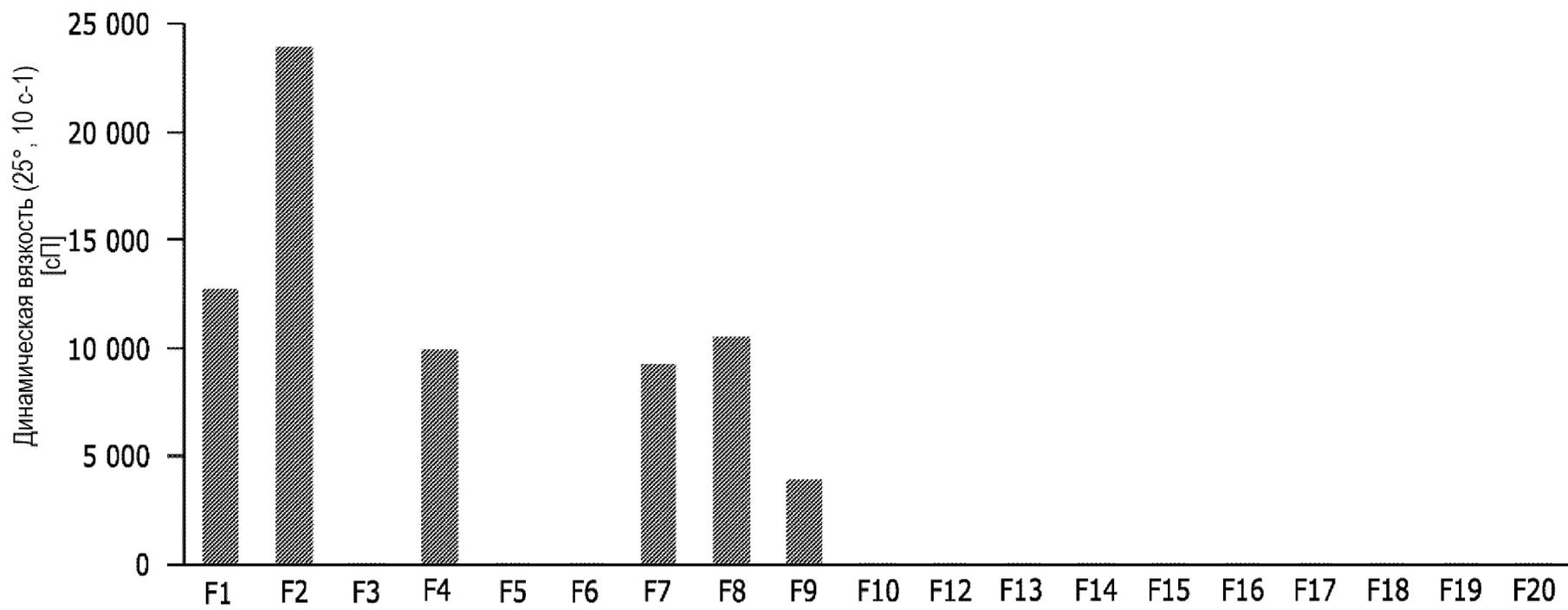
Содержание белка
верхняя фаза:
59,9 мг/мл
нижняя фаза:
163,1 мг/мл

Фиг. 2В

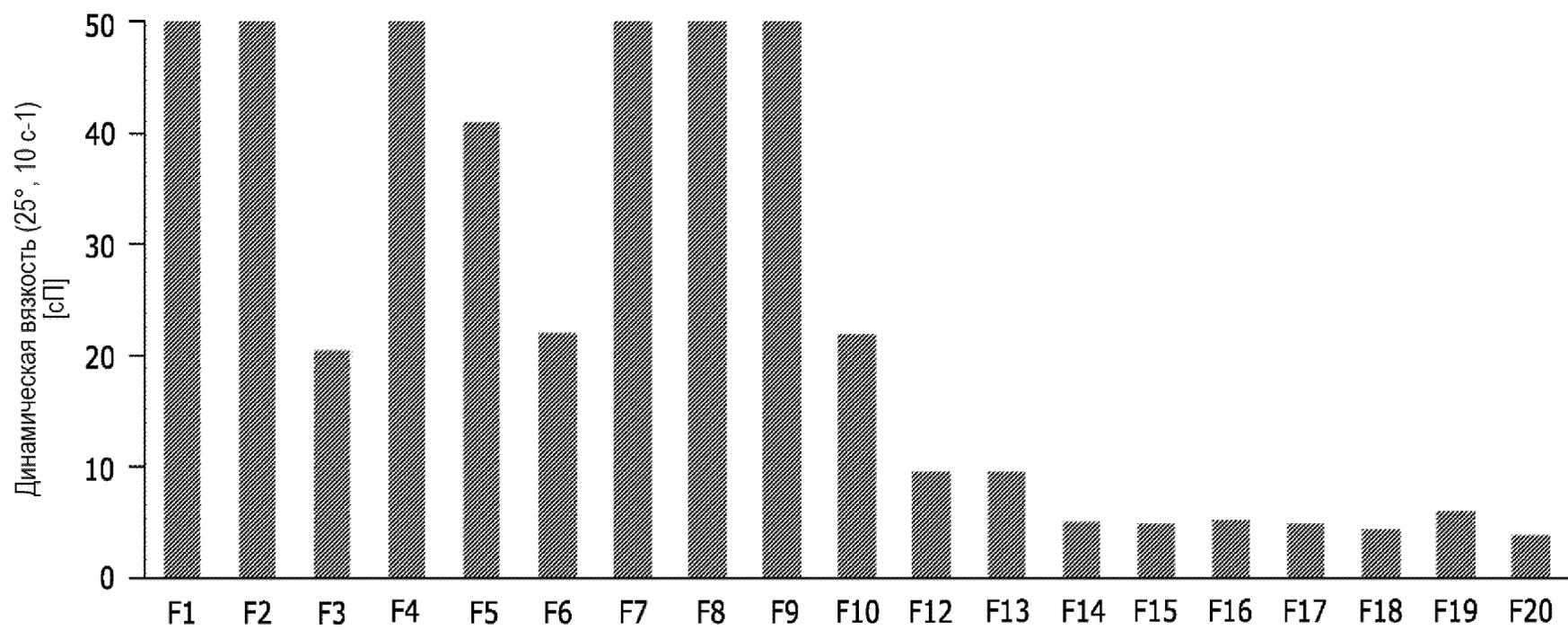


4/50

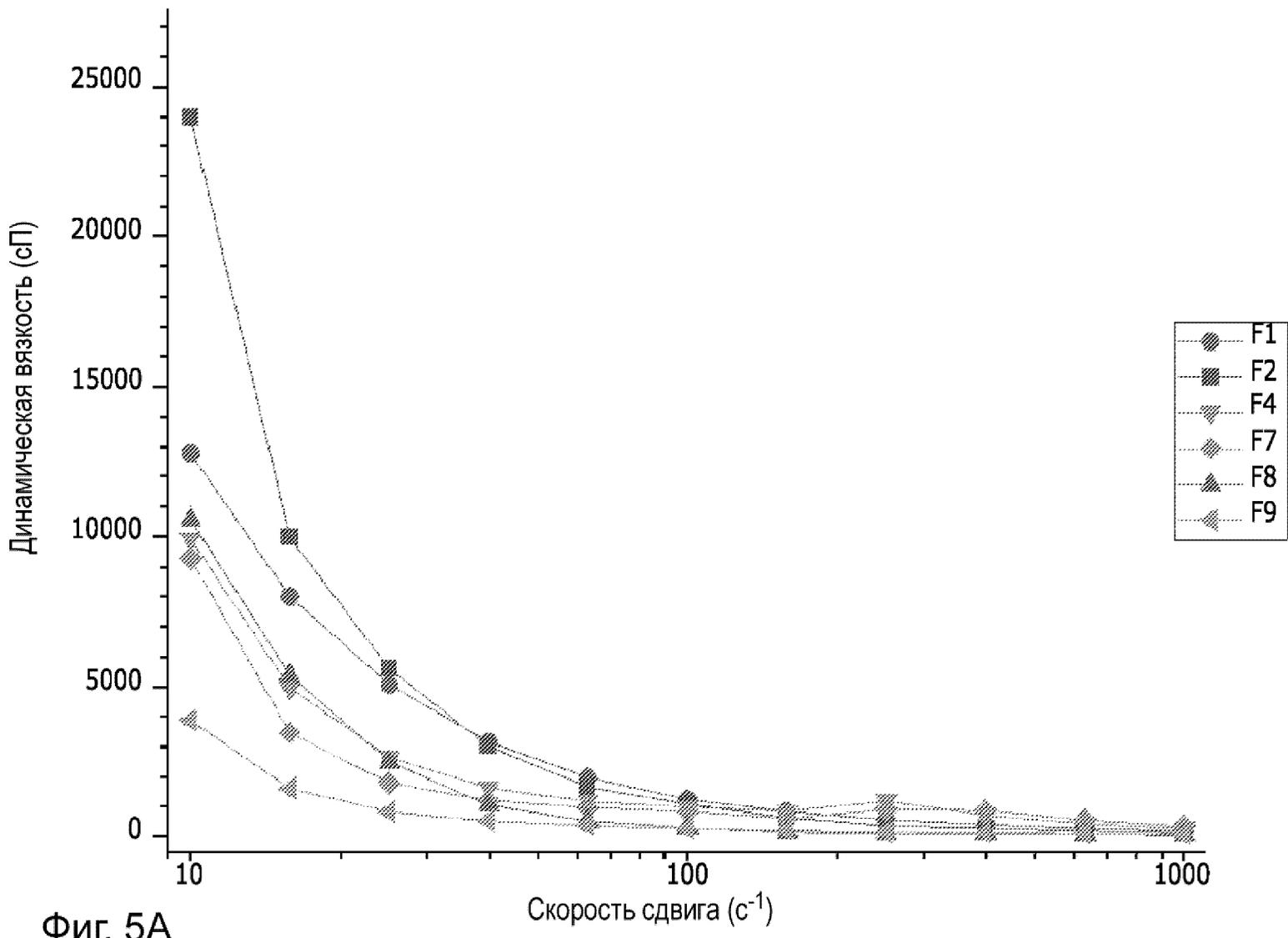
Фиг. 3

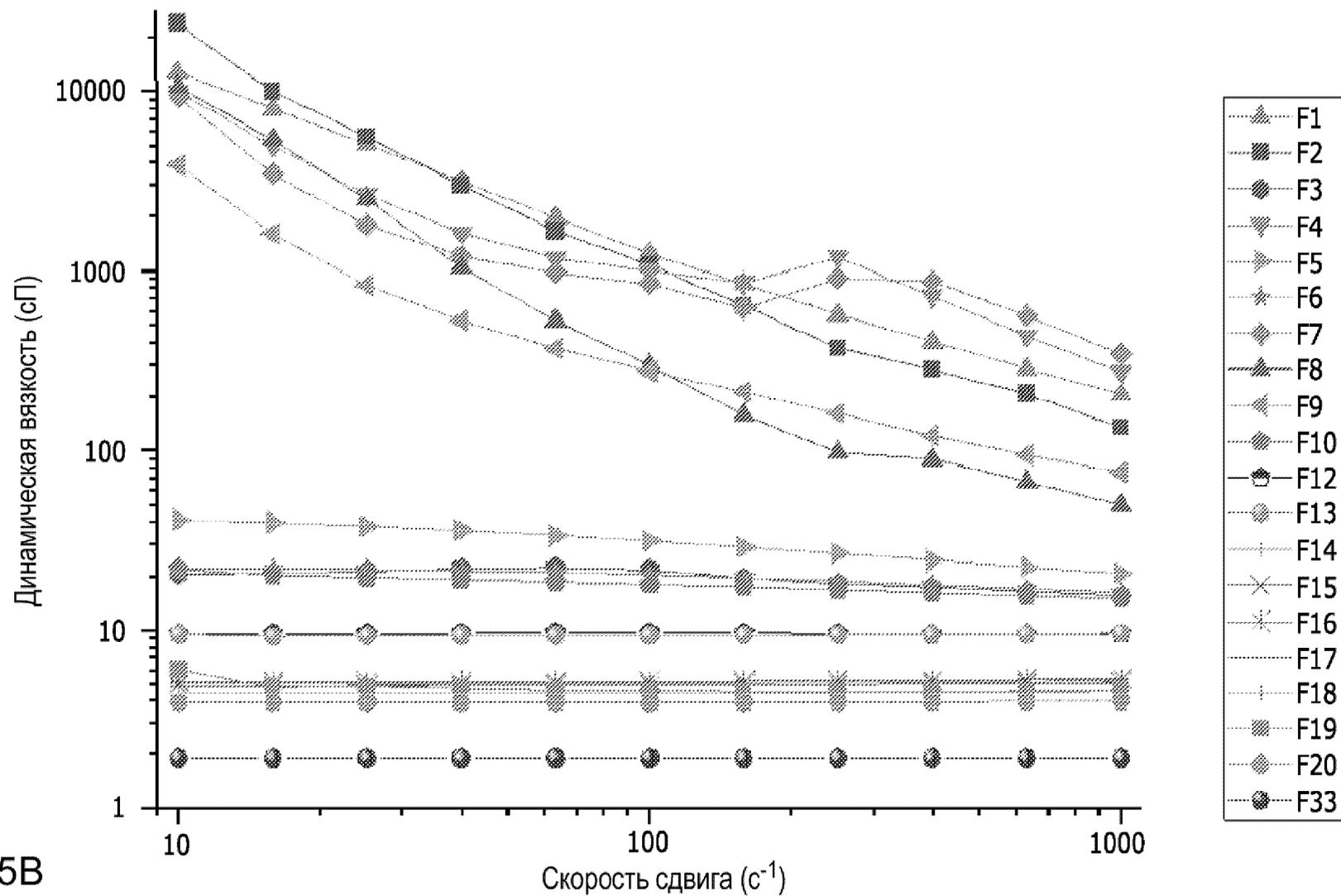


Фиг. 4А

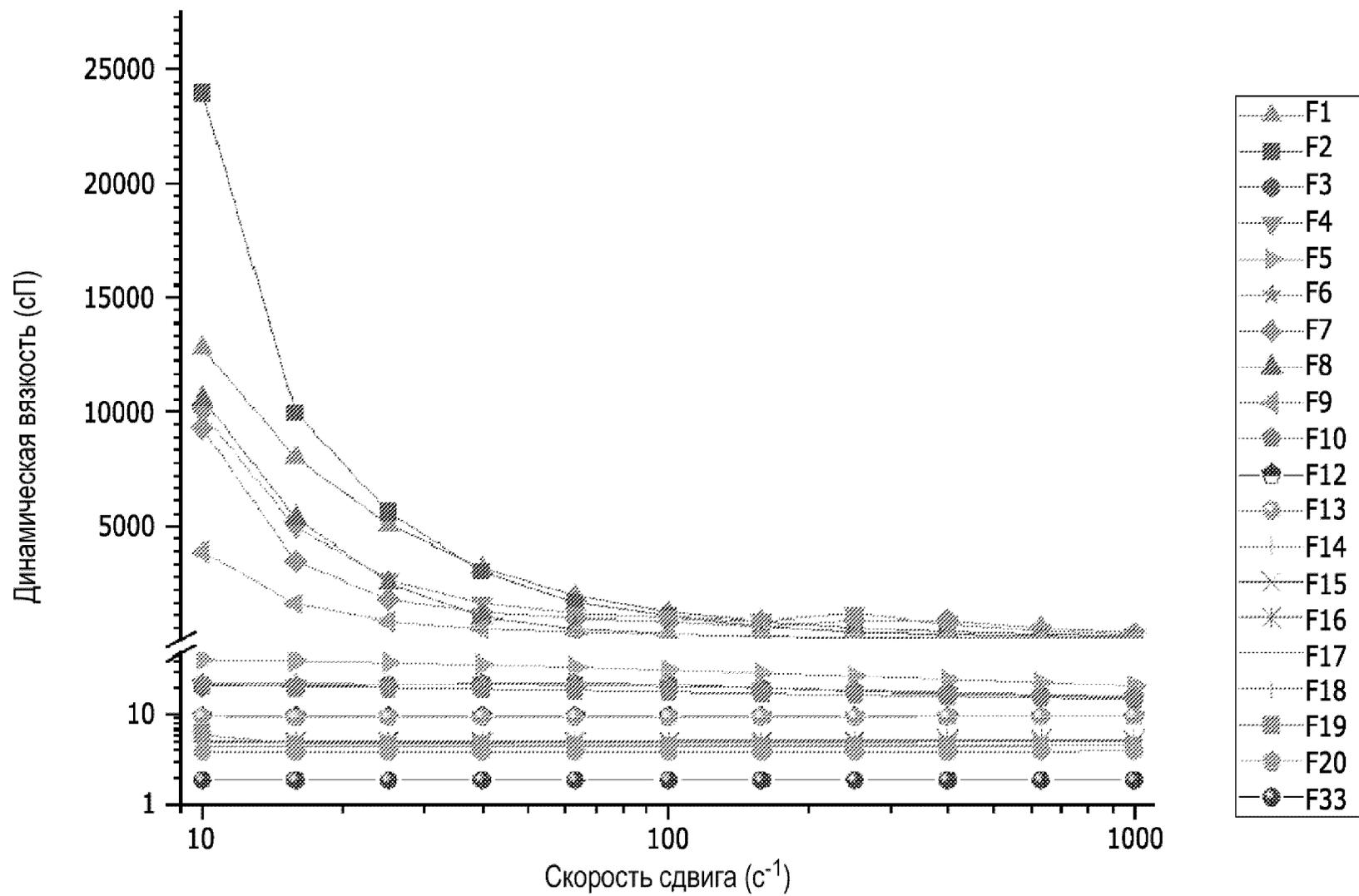


Фиг. 4В



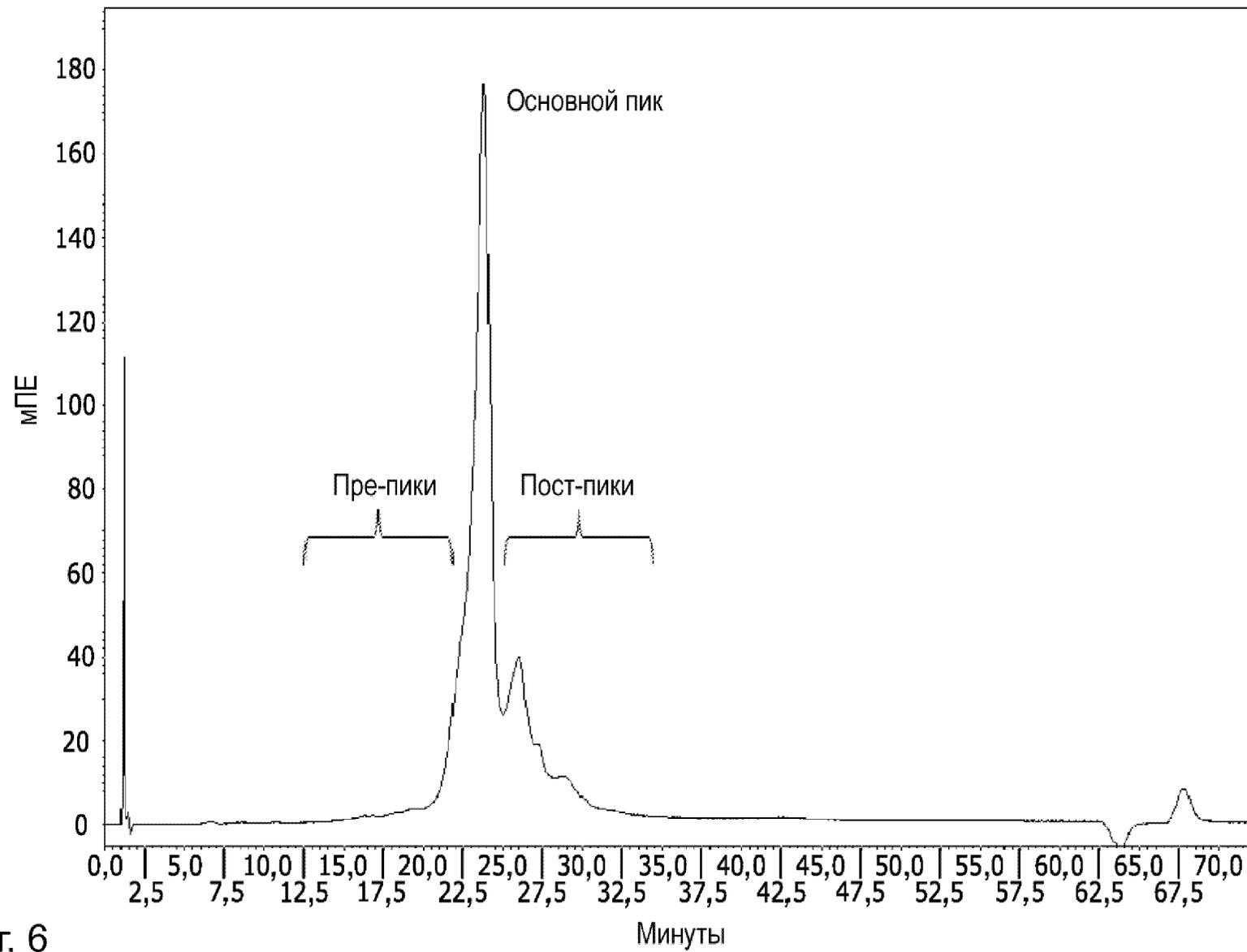


Фиг. 5В

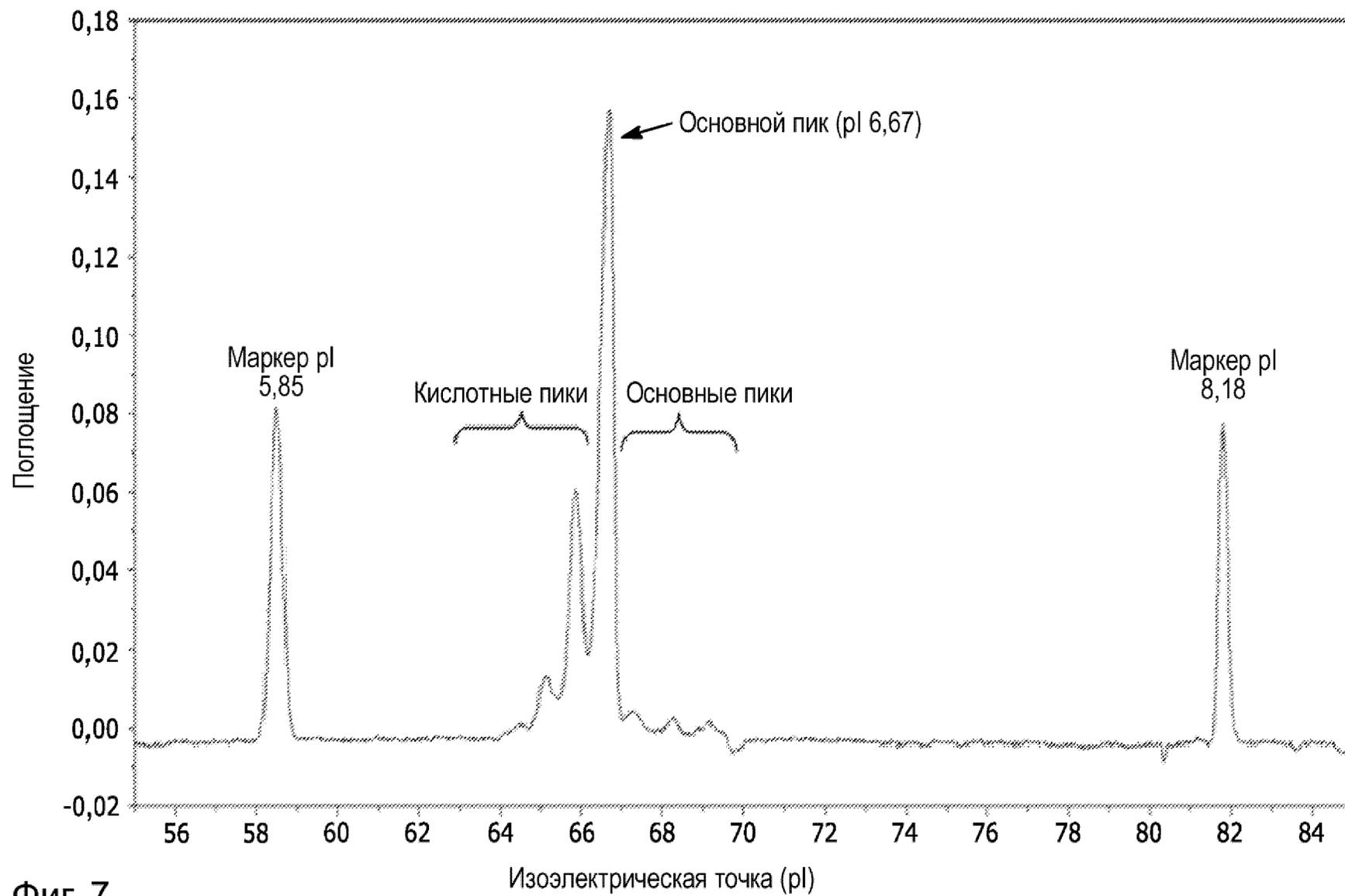


9/50

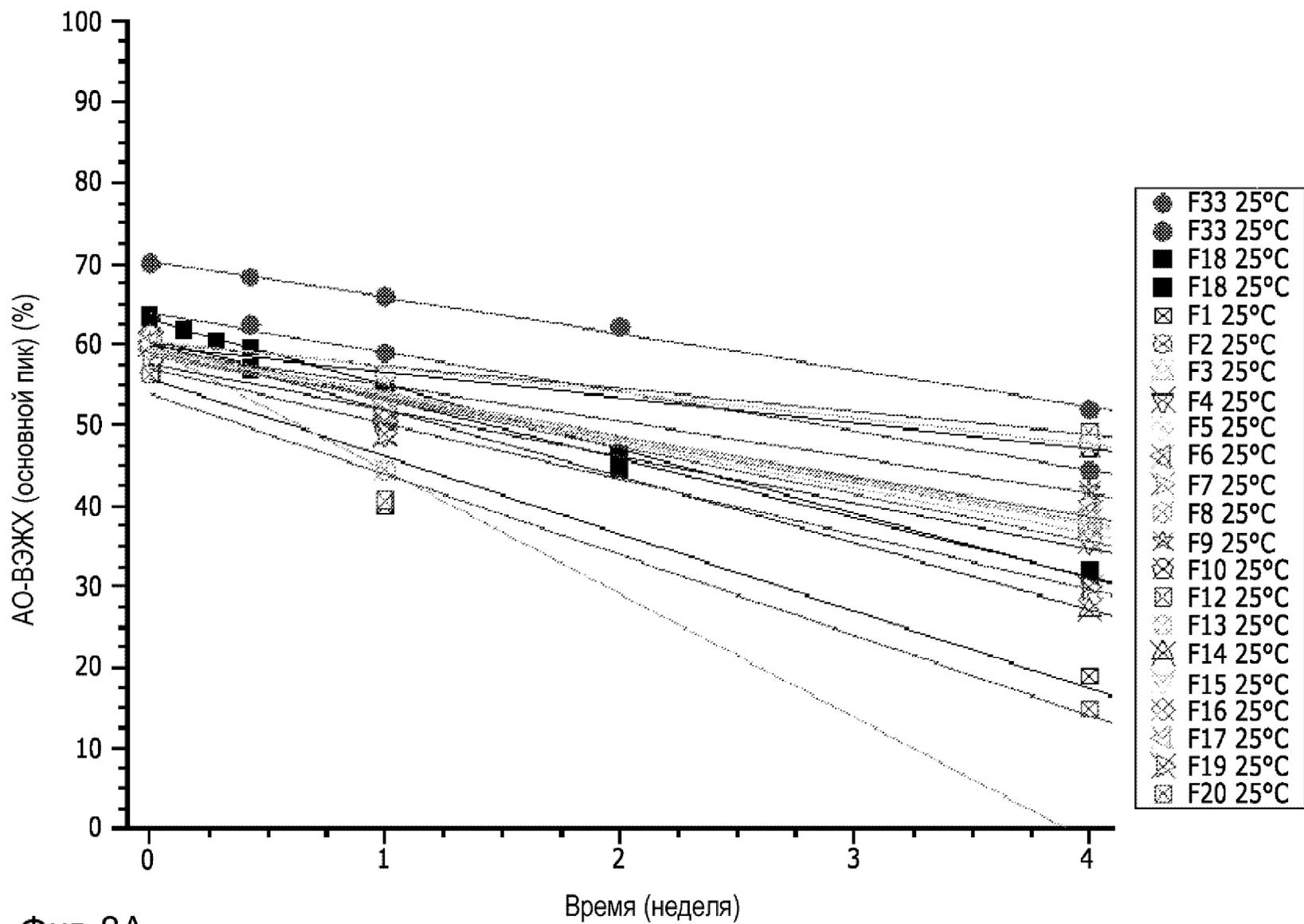
Фиг. 5С



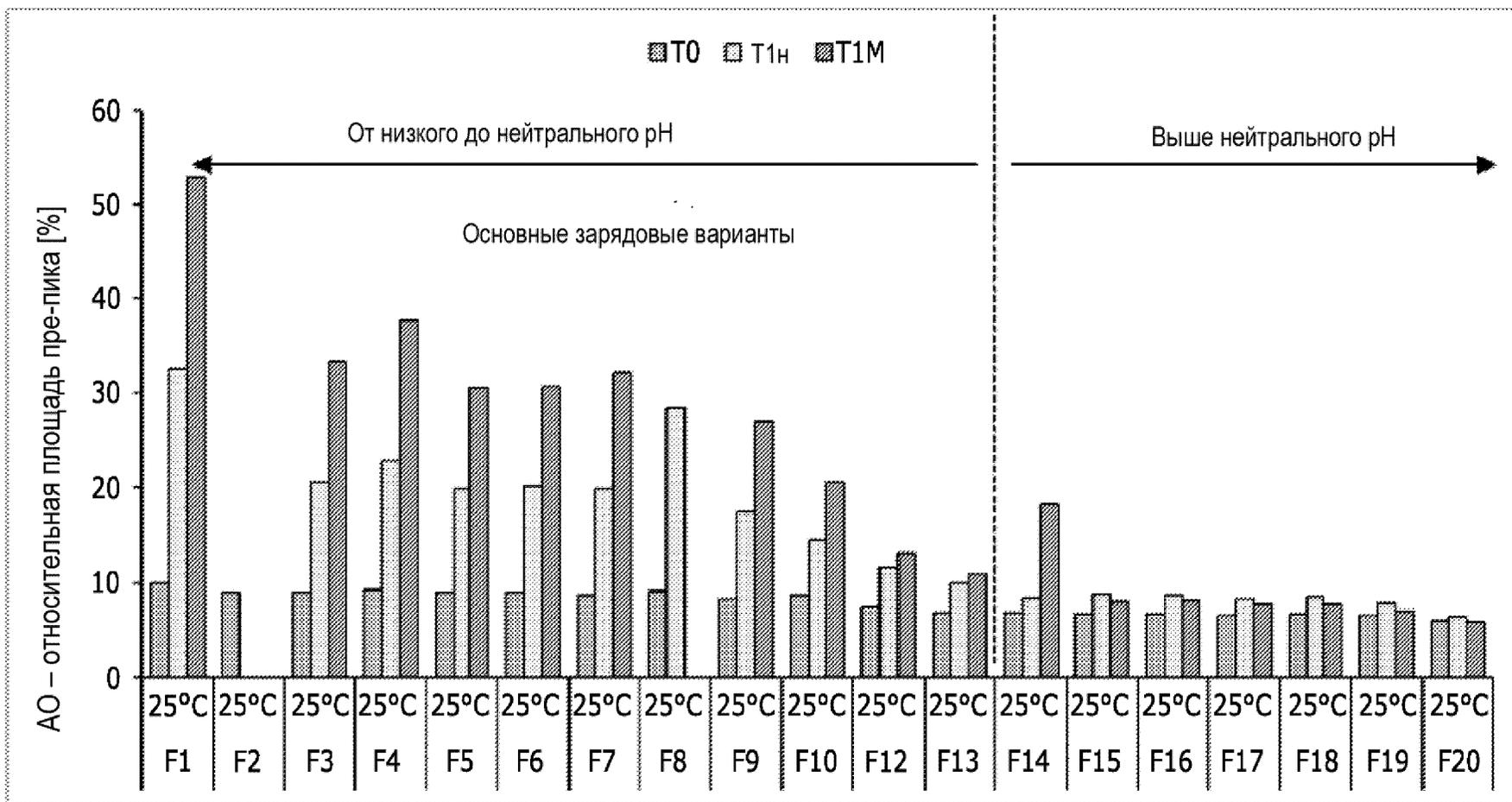
Фиг. 6



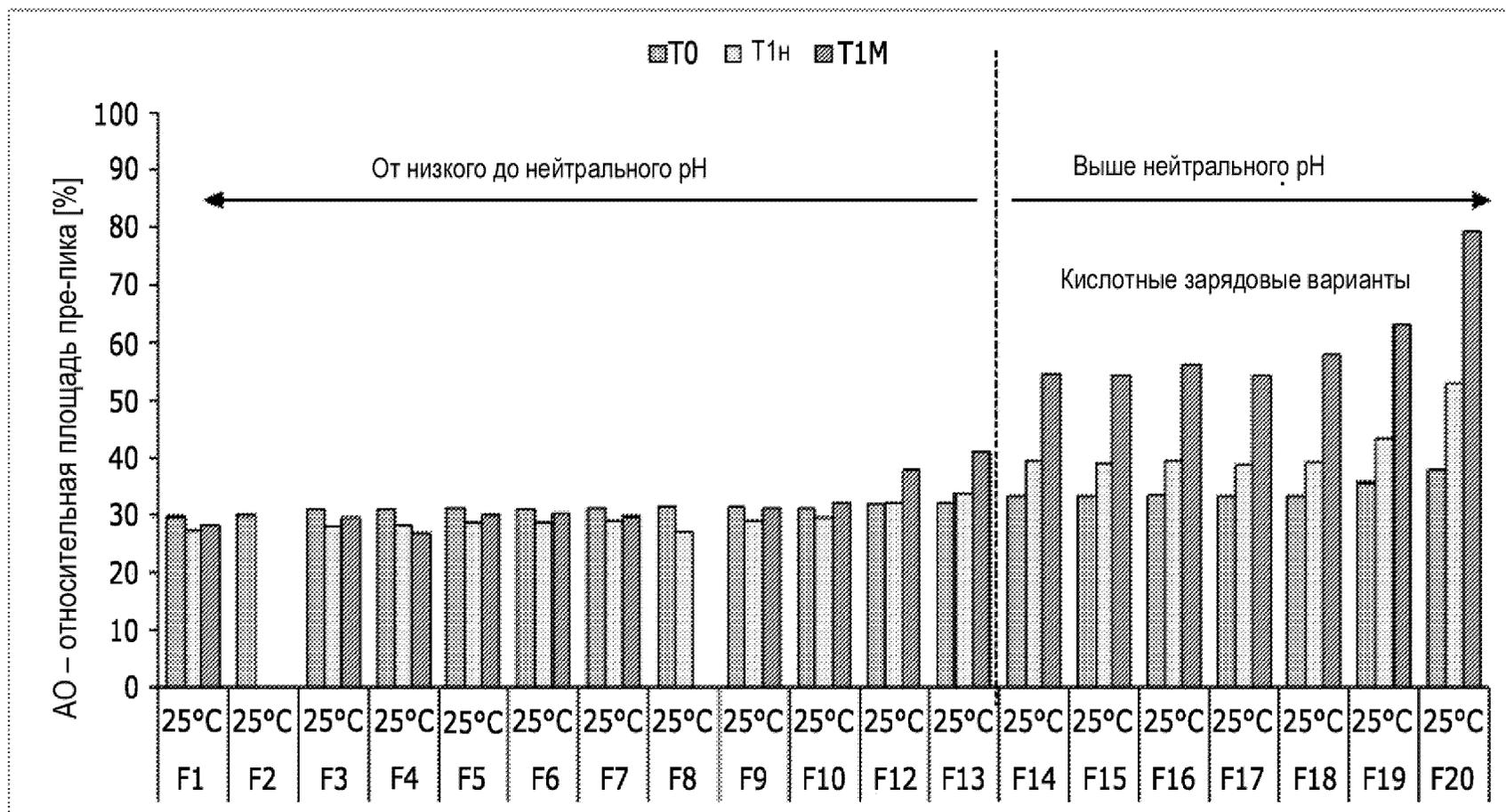
Фиг. 7



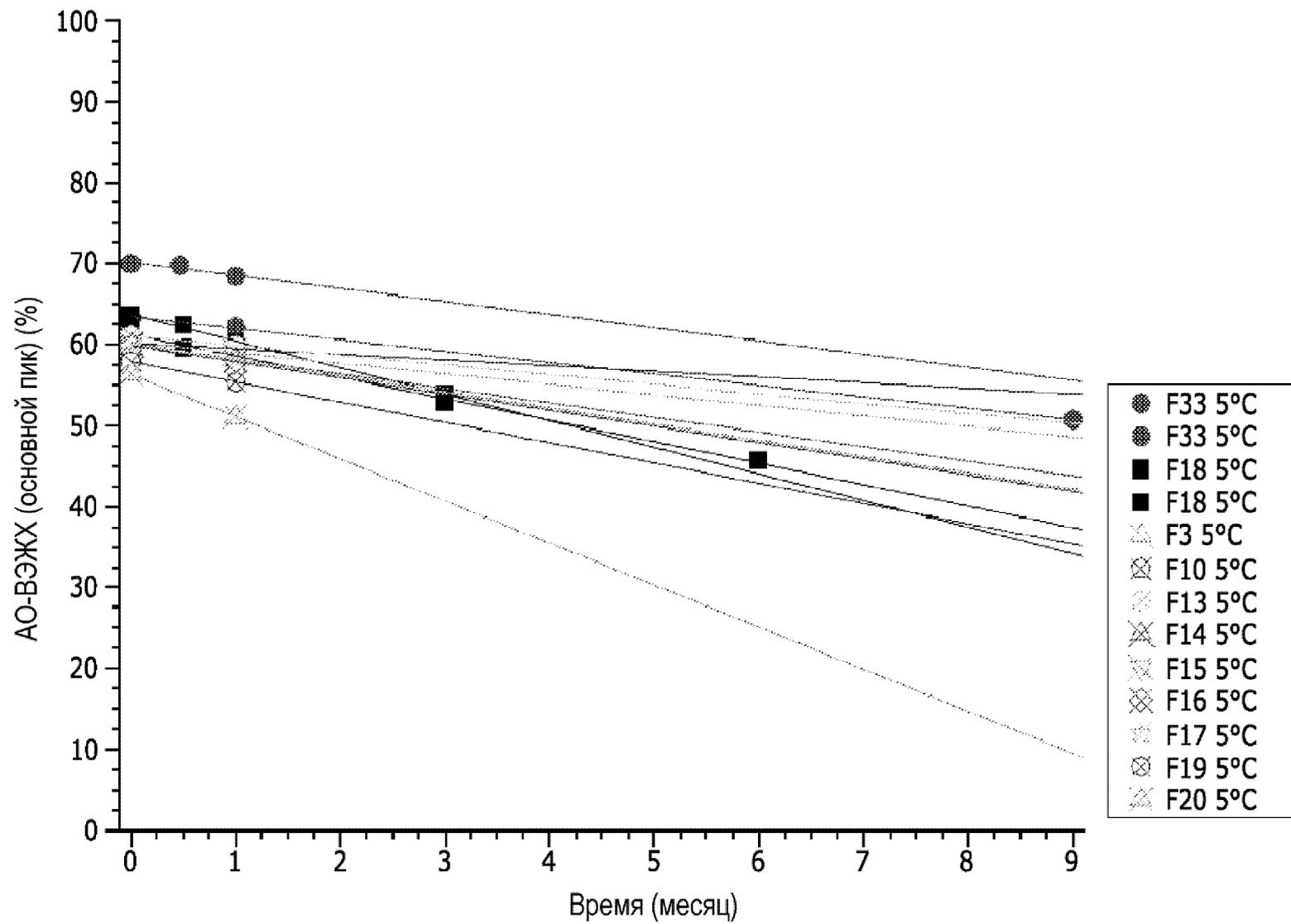
Фиг. 8А



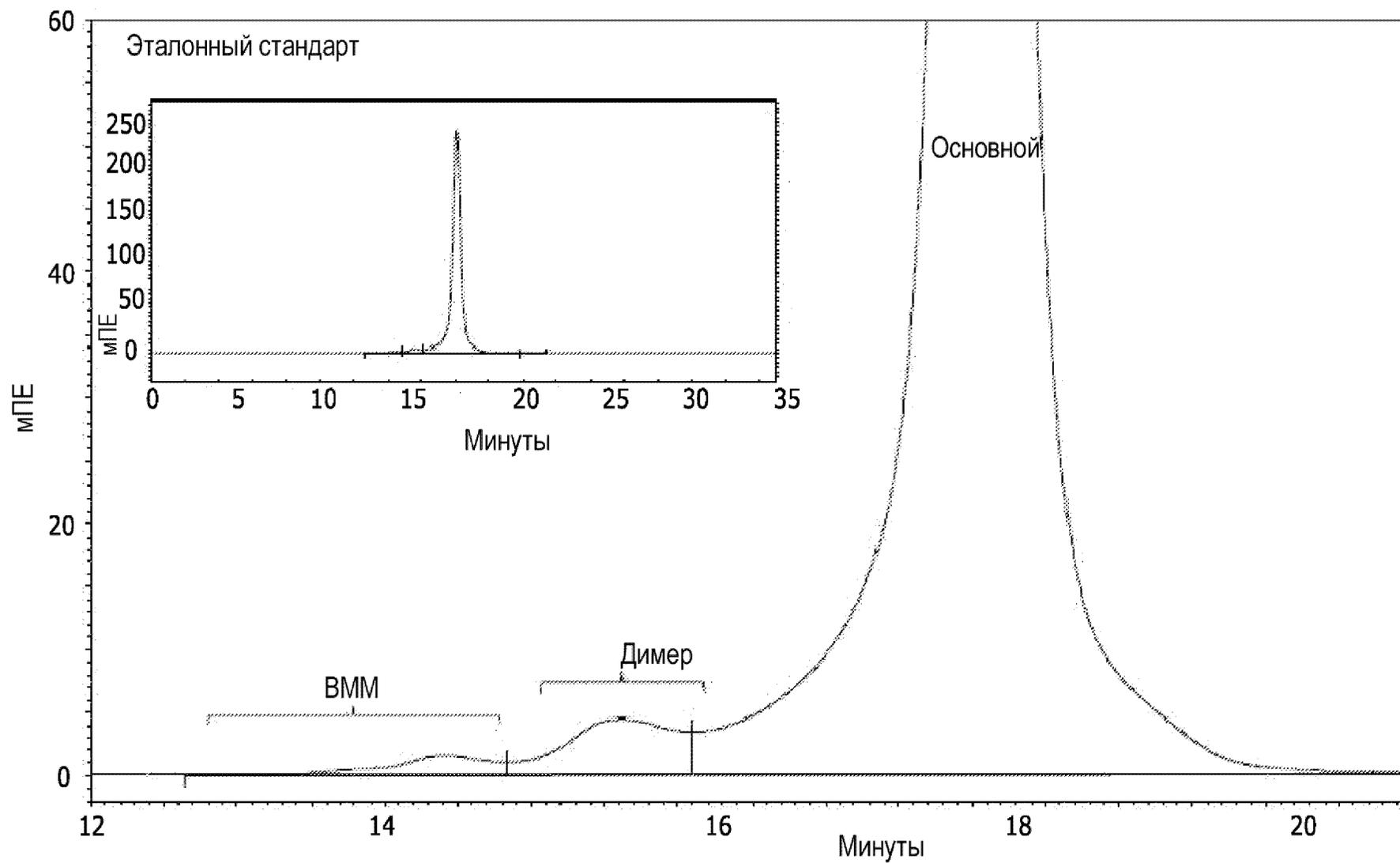
Фиг. 8В



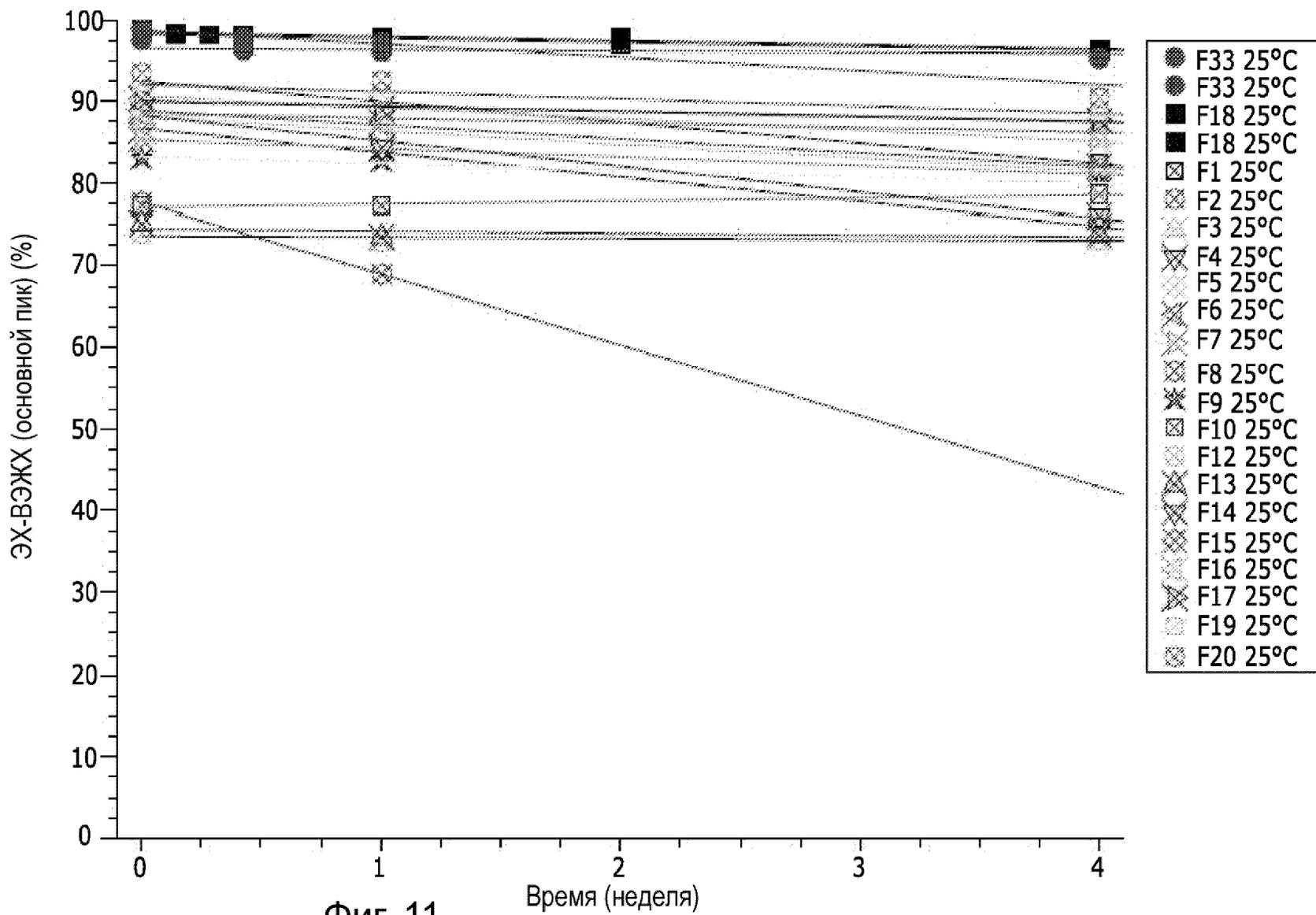
Фиг. 8С

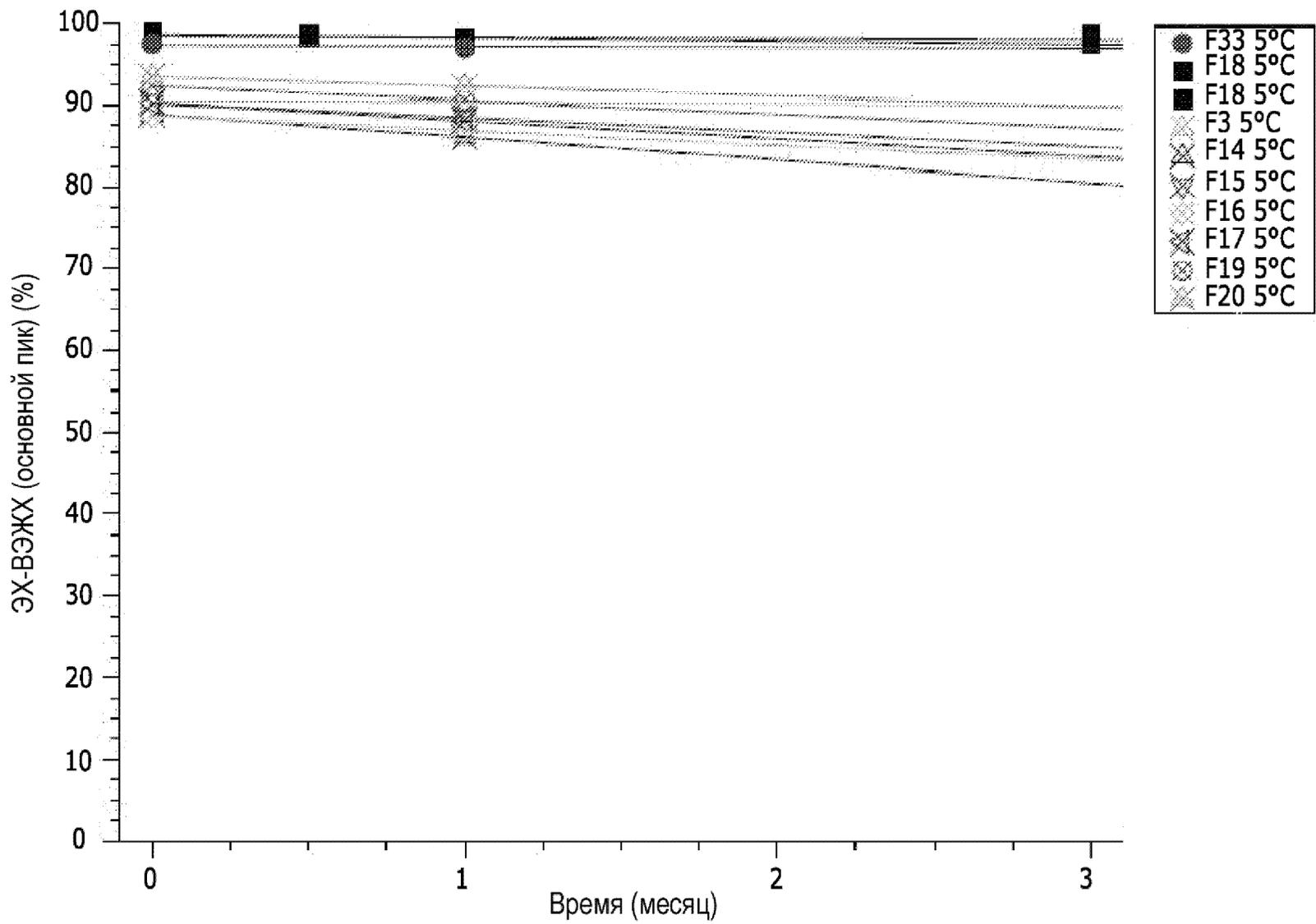


Фиг. 9

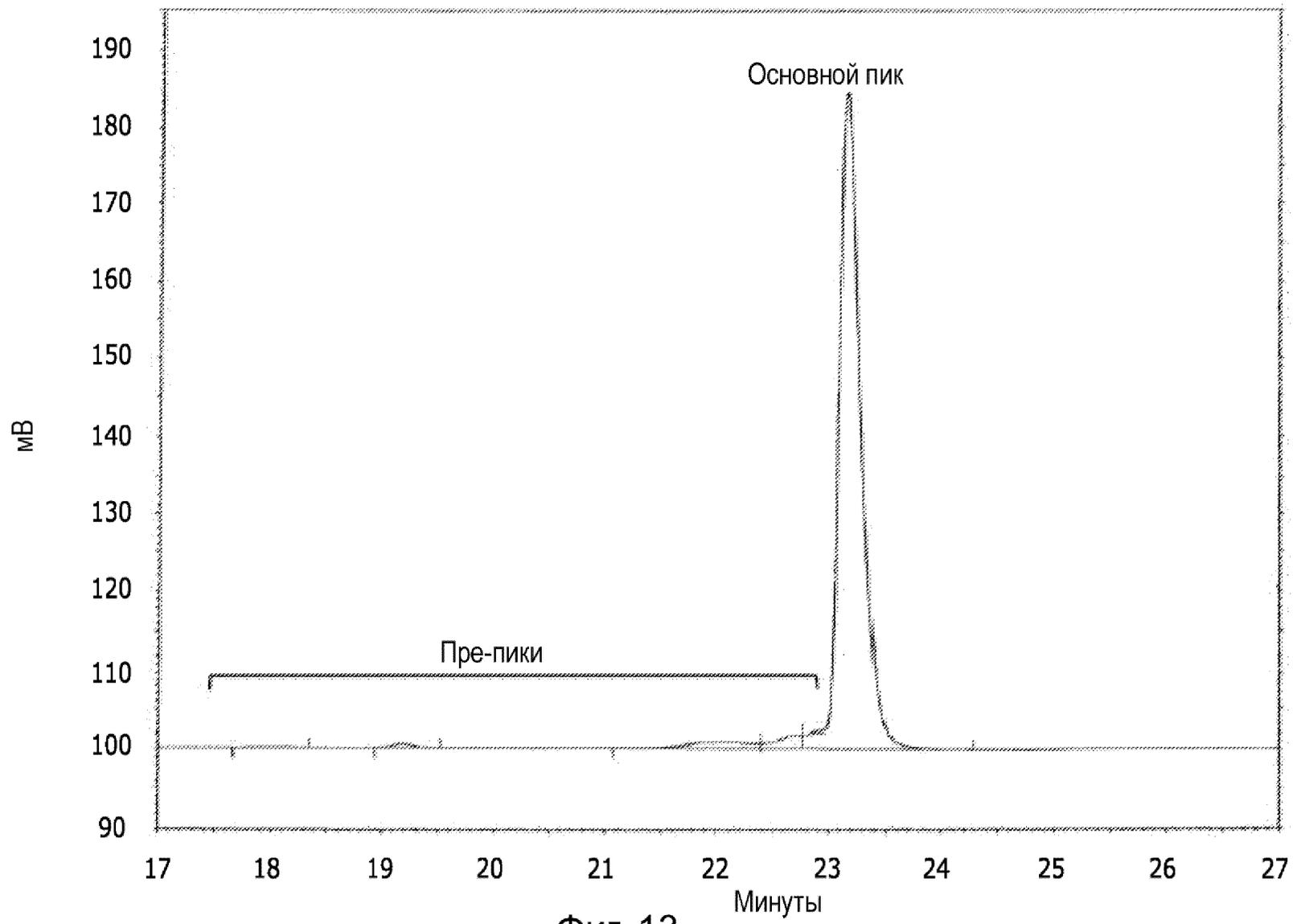


Фиг. 10

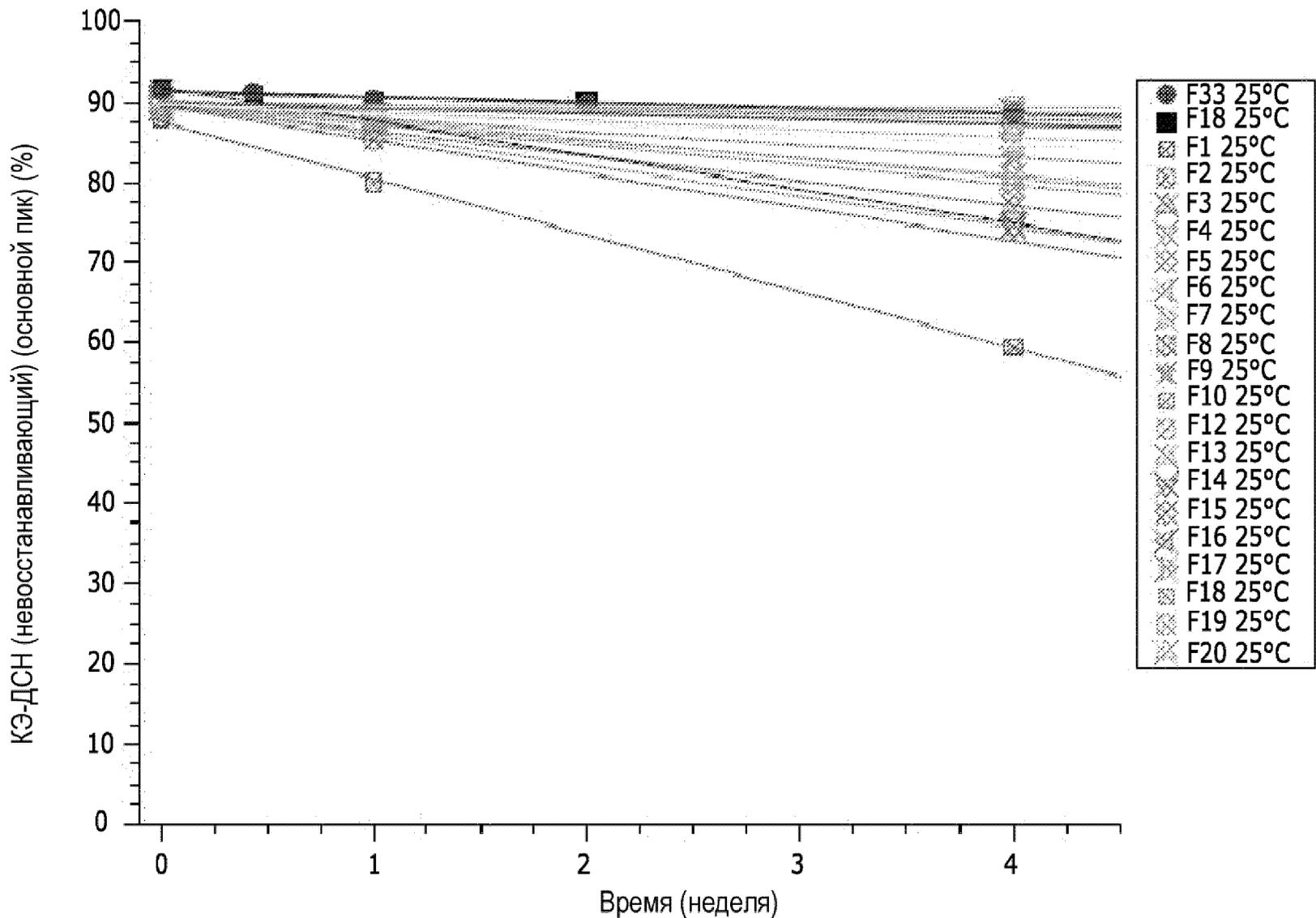




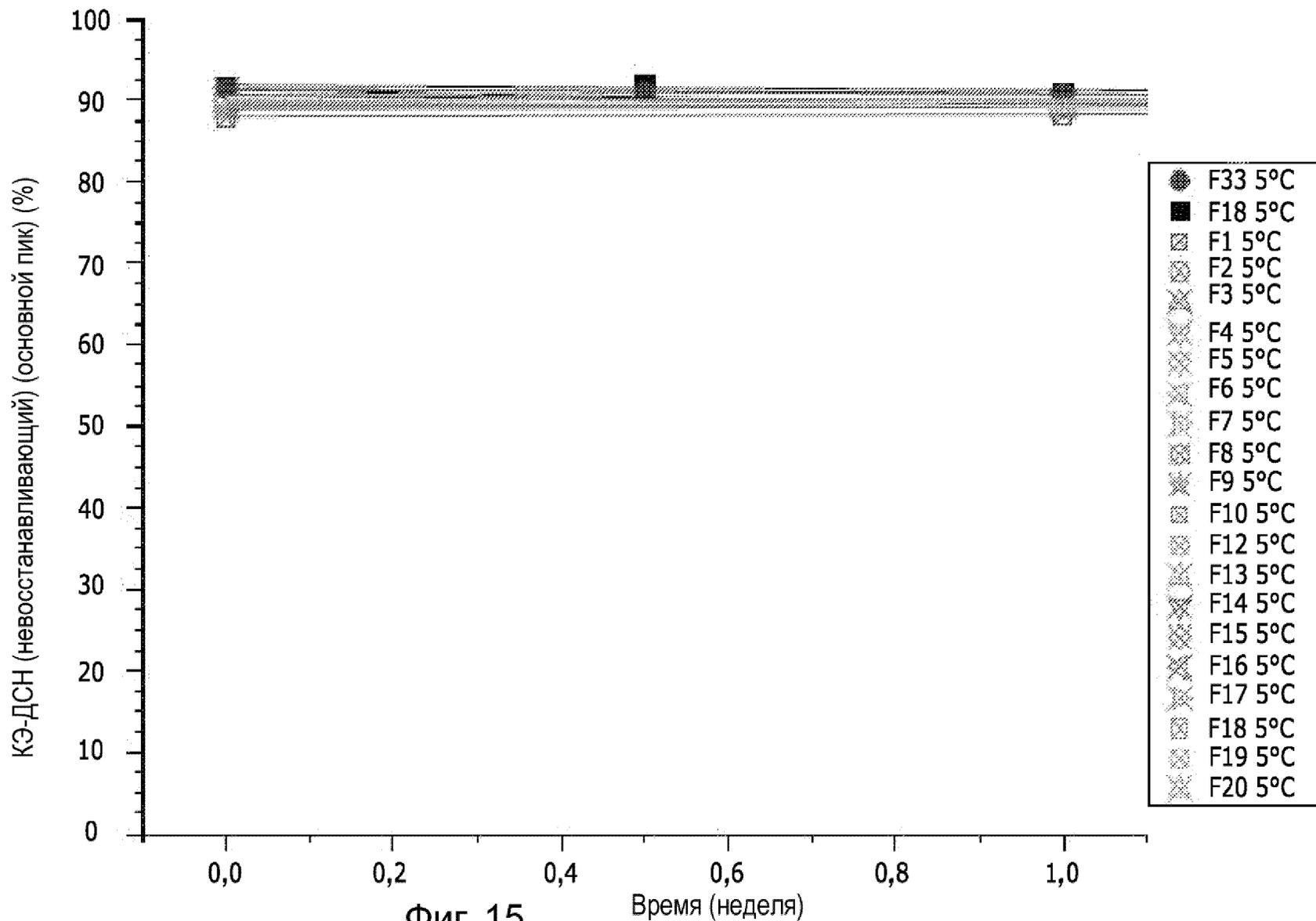
Фиг. 12

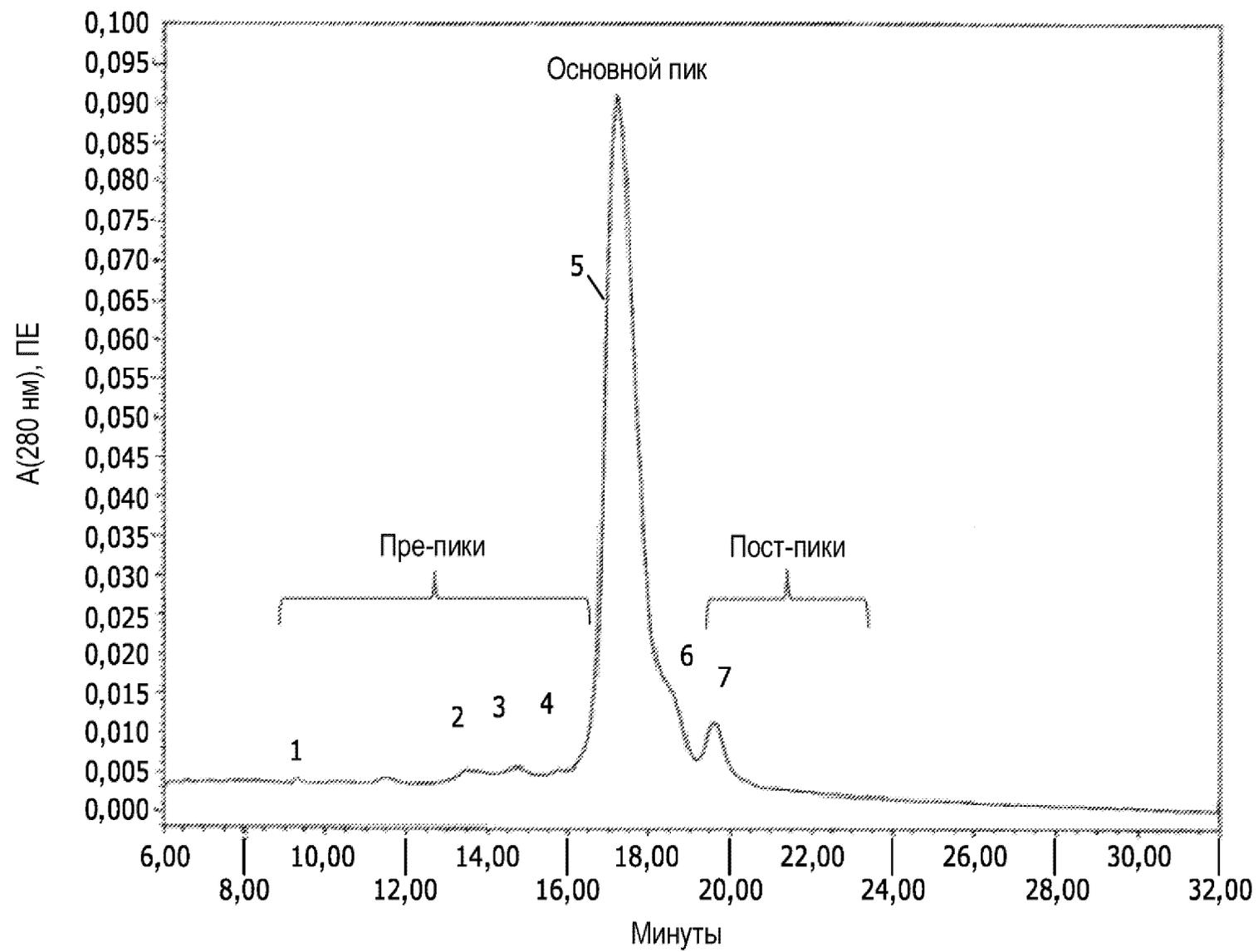


Фиг. 13

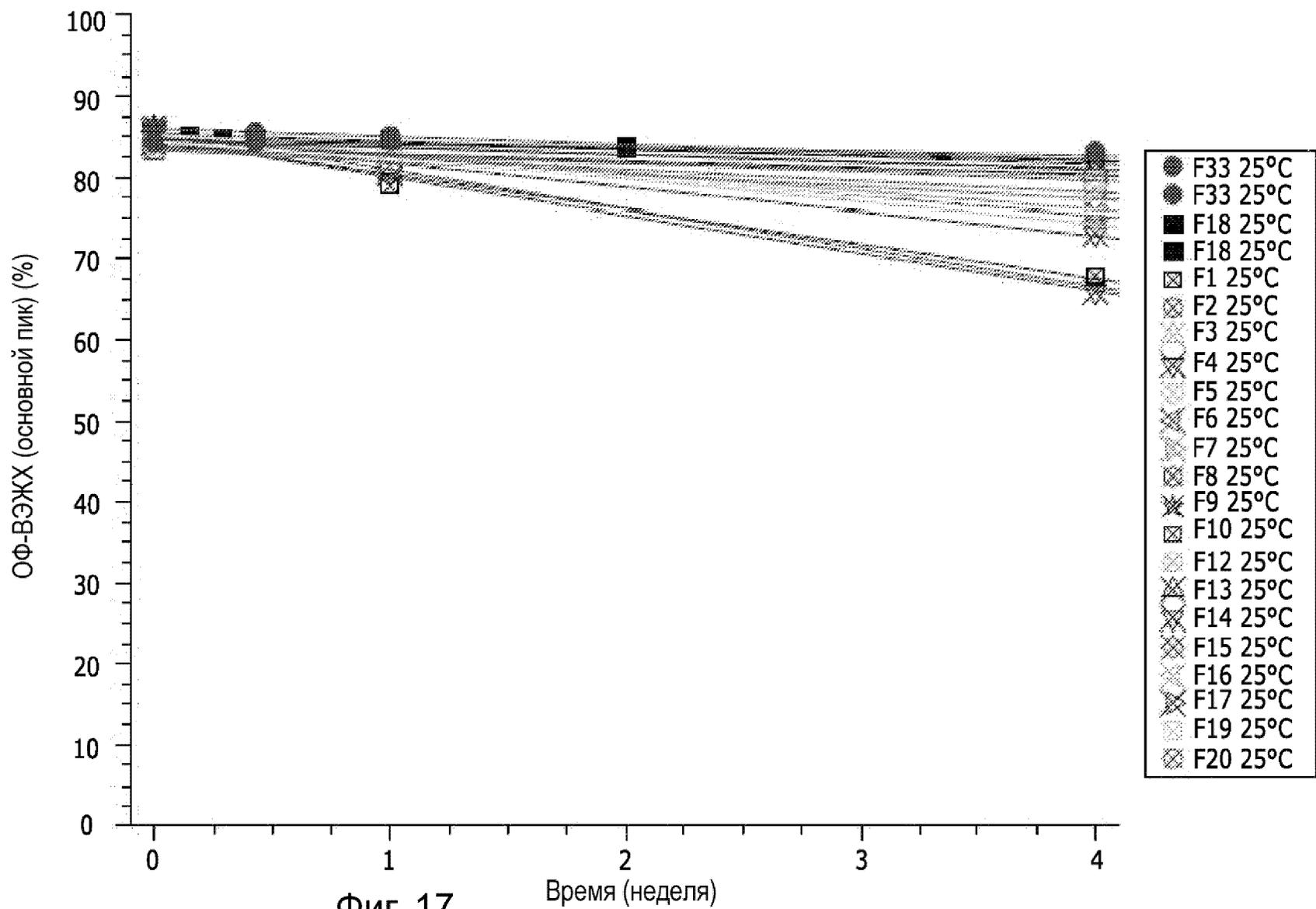


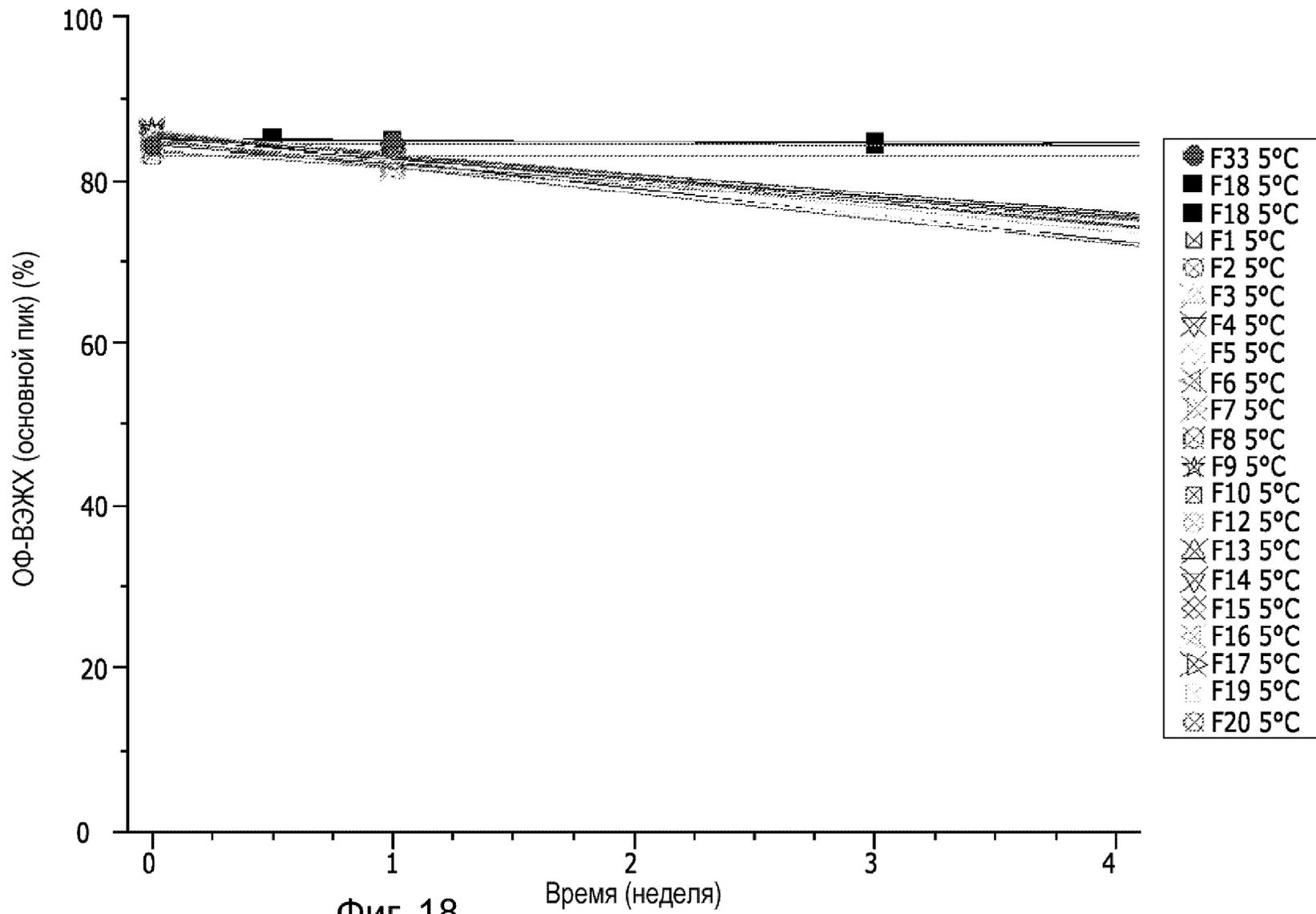
Фиг. 14

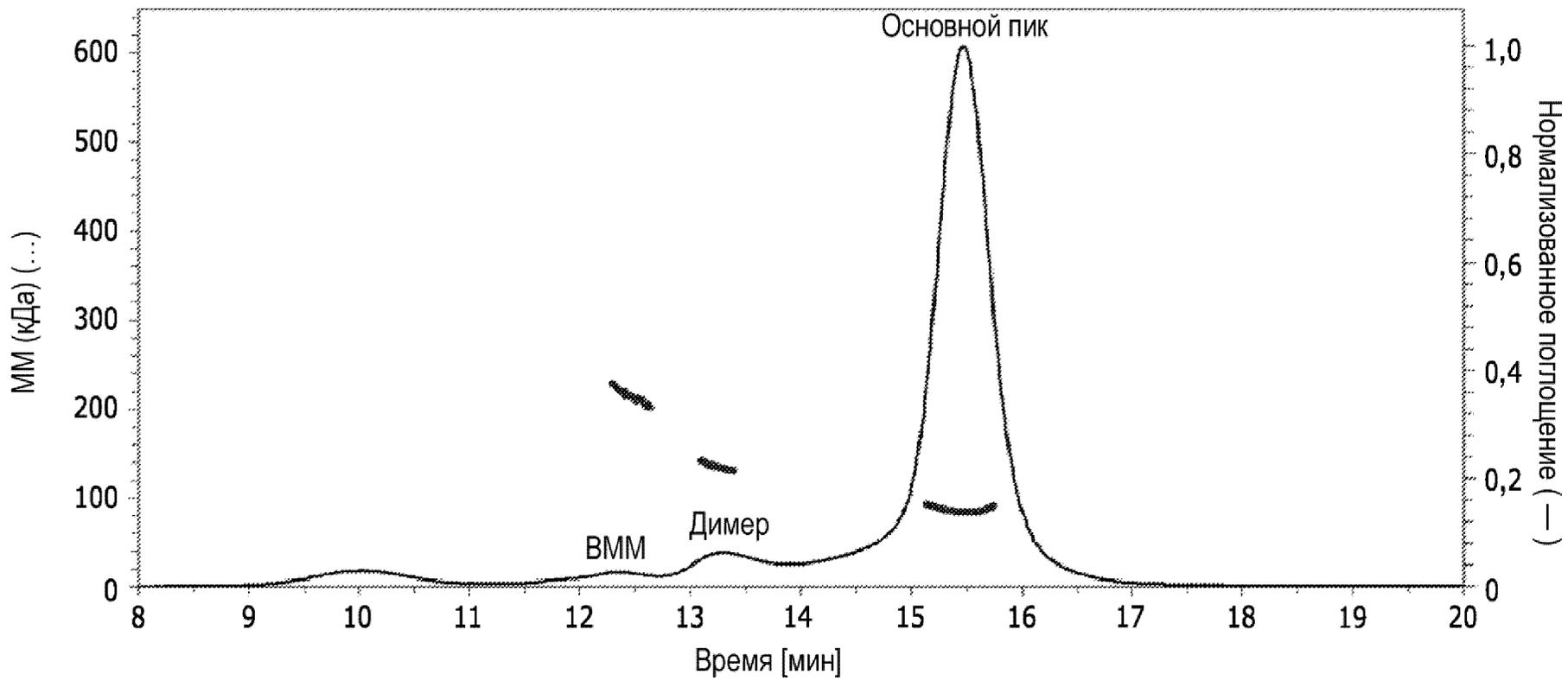




Фиг. 16

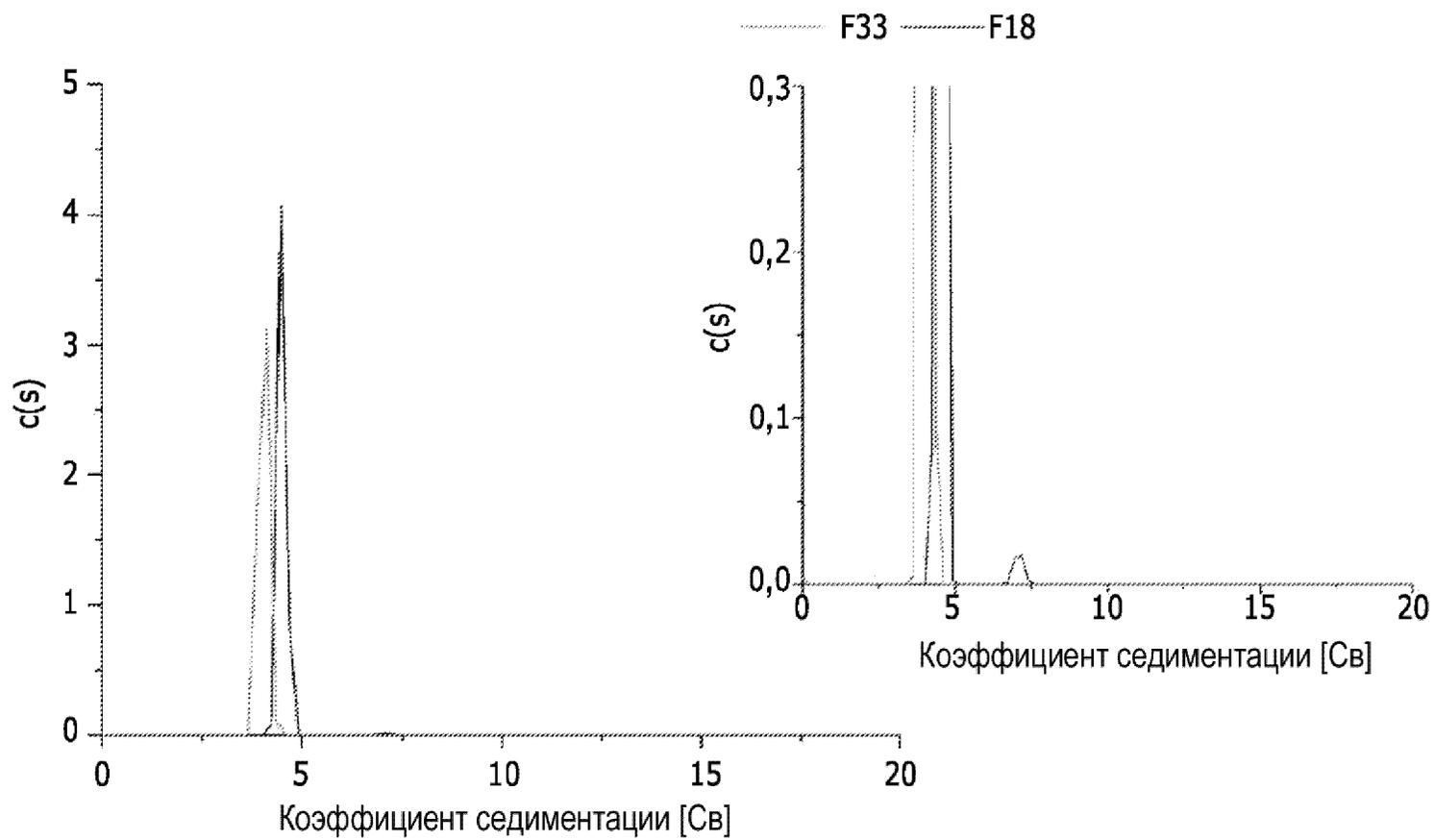




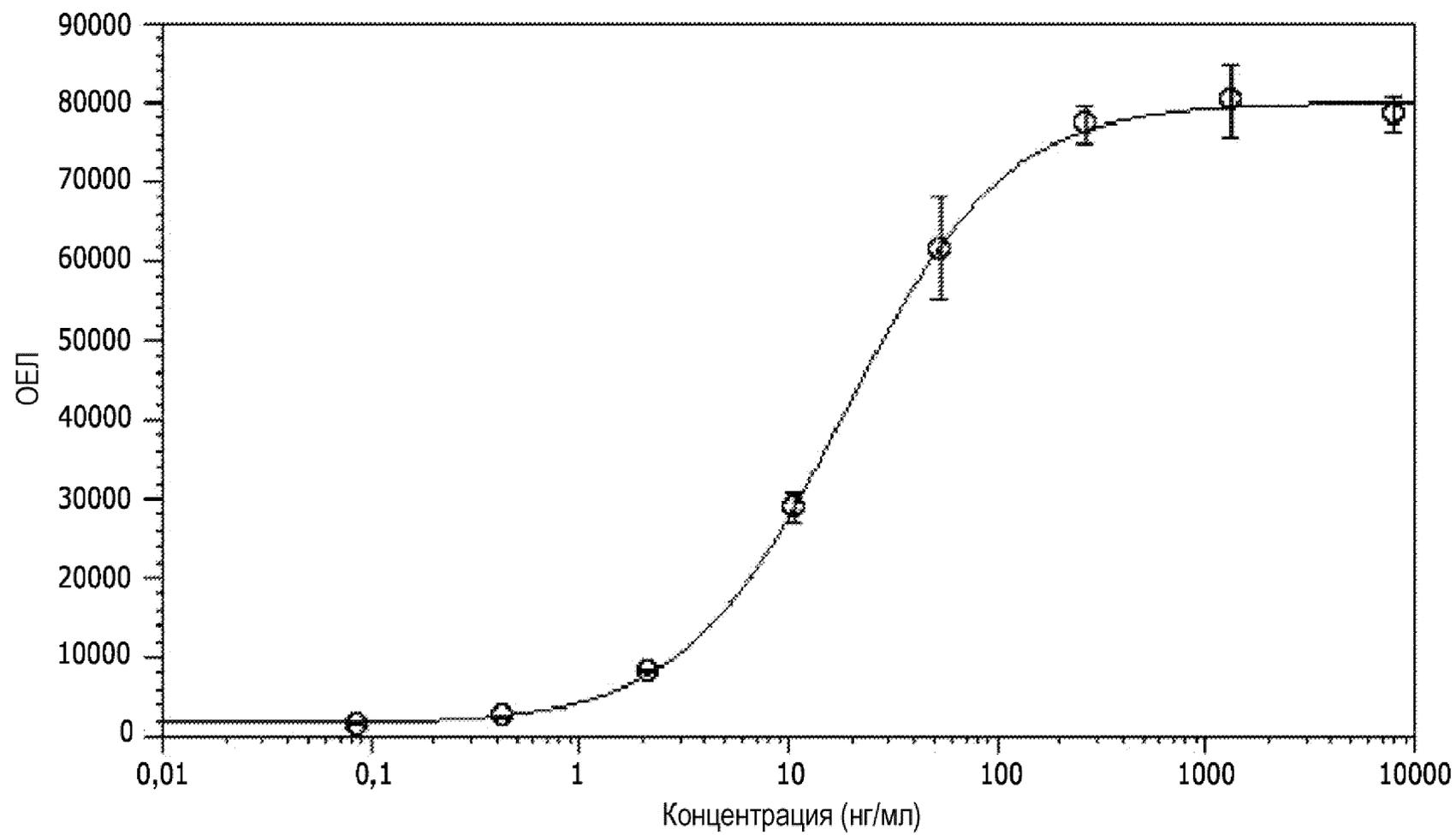


25/50

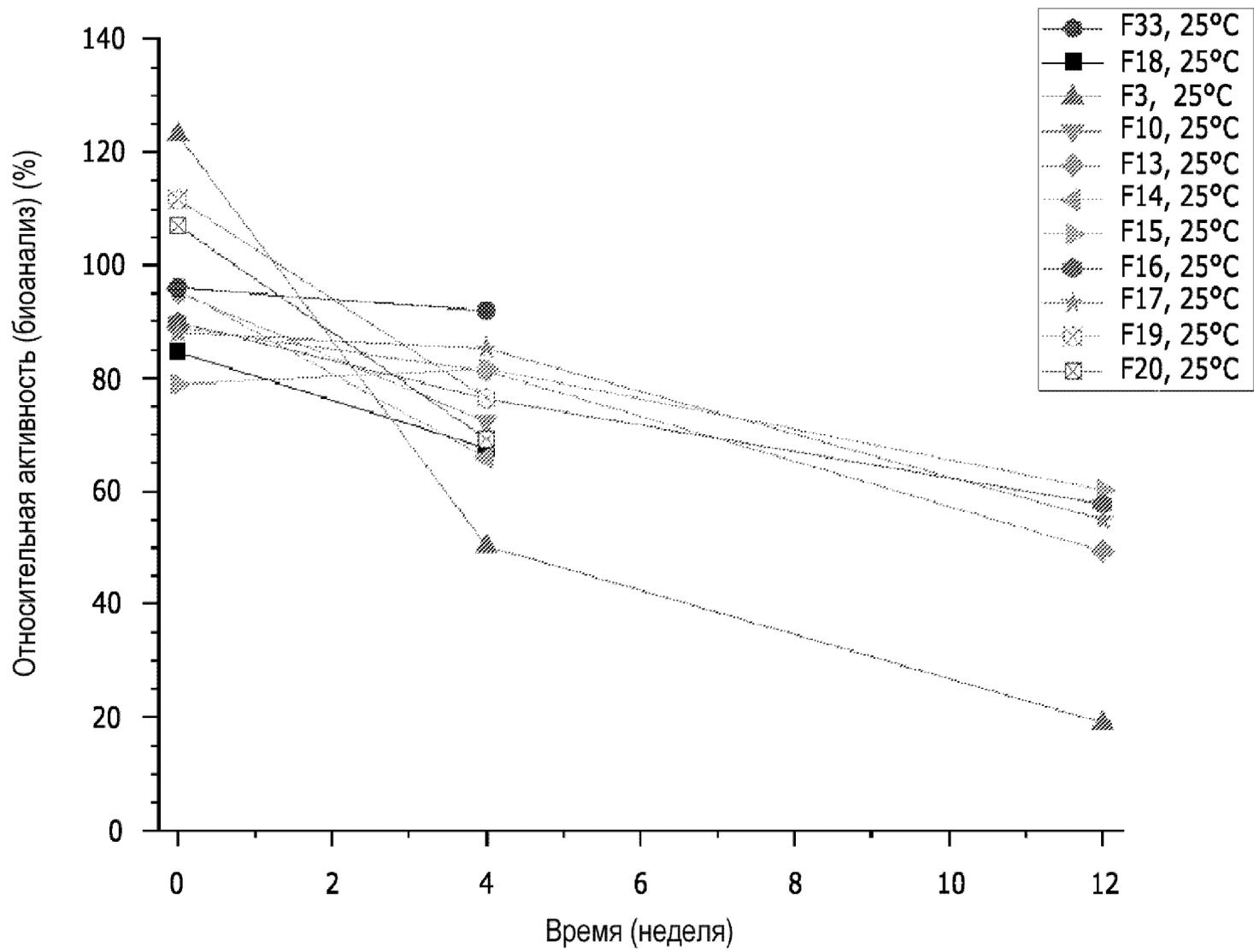
Фиг. 19



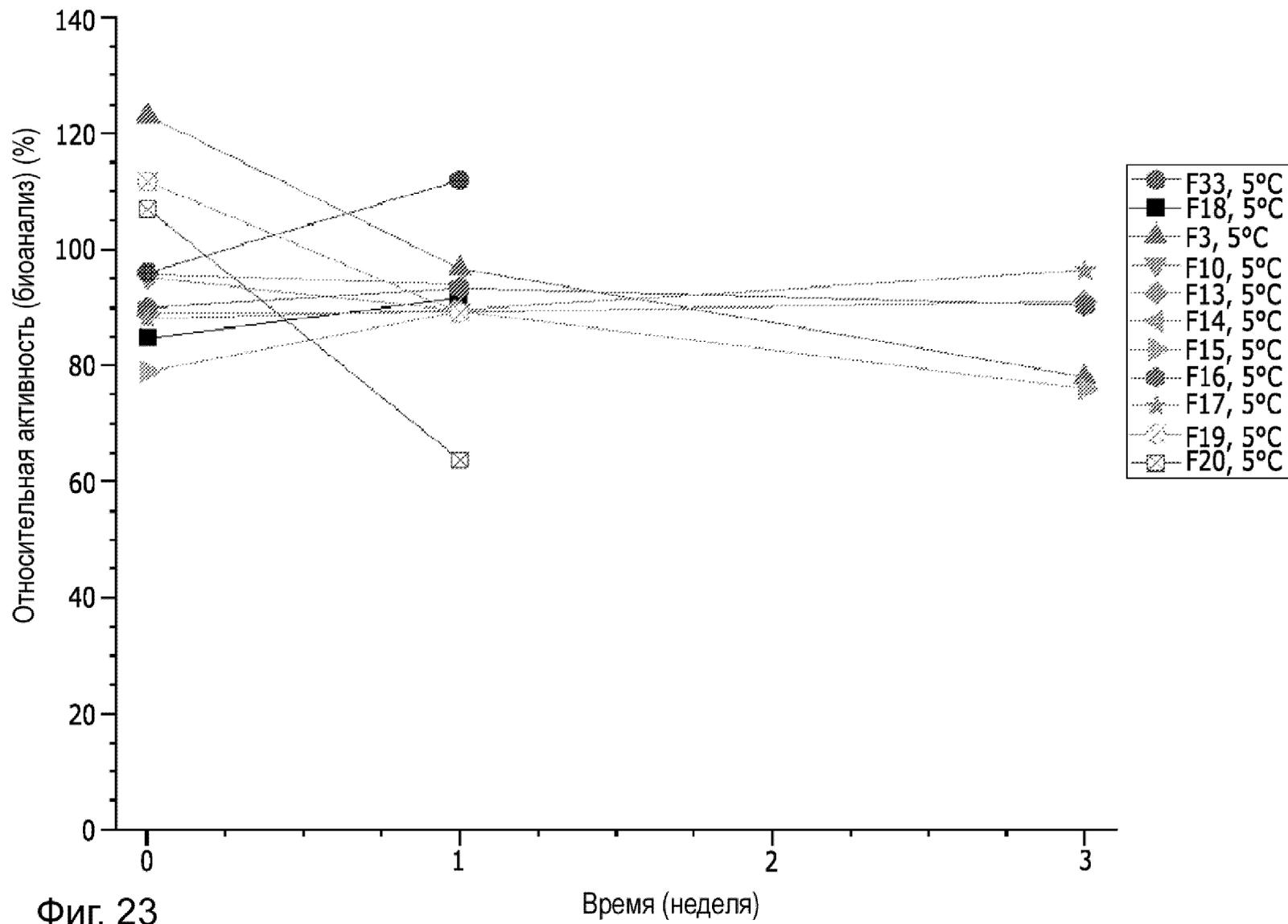
Фиг. 20

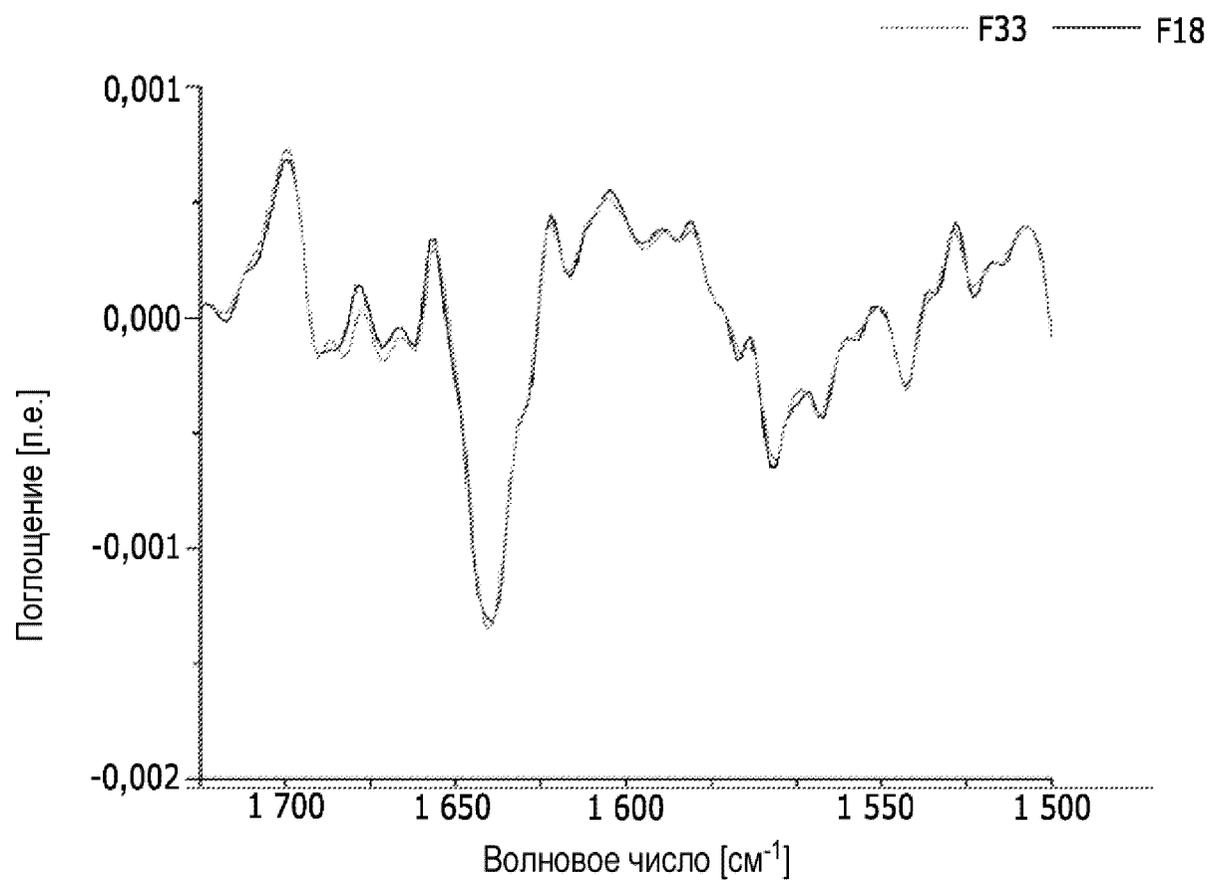


Фиг. 21

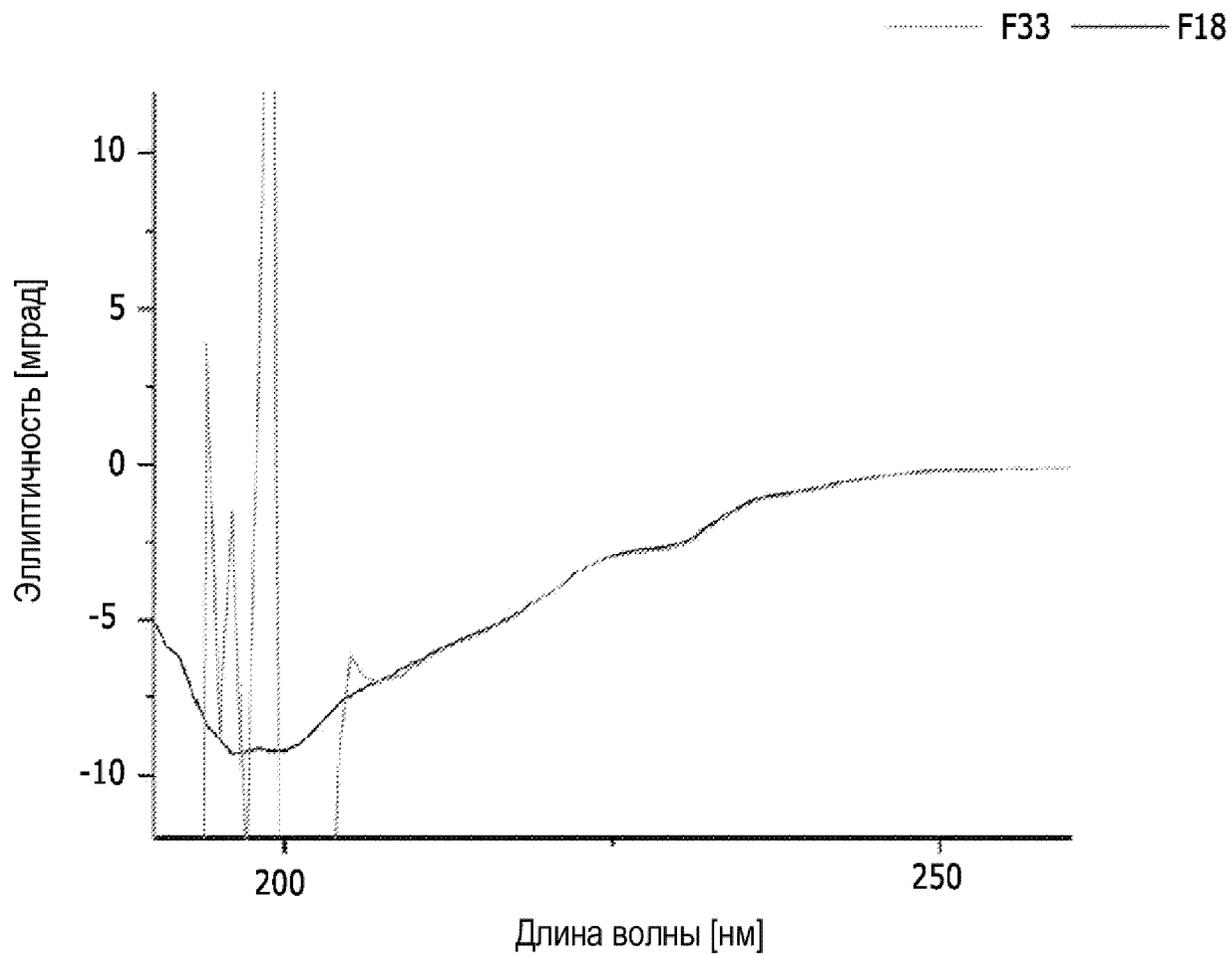


Фиг. 22

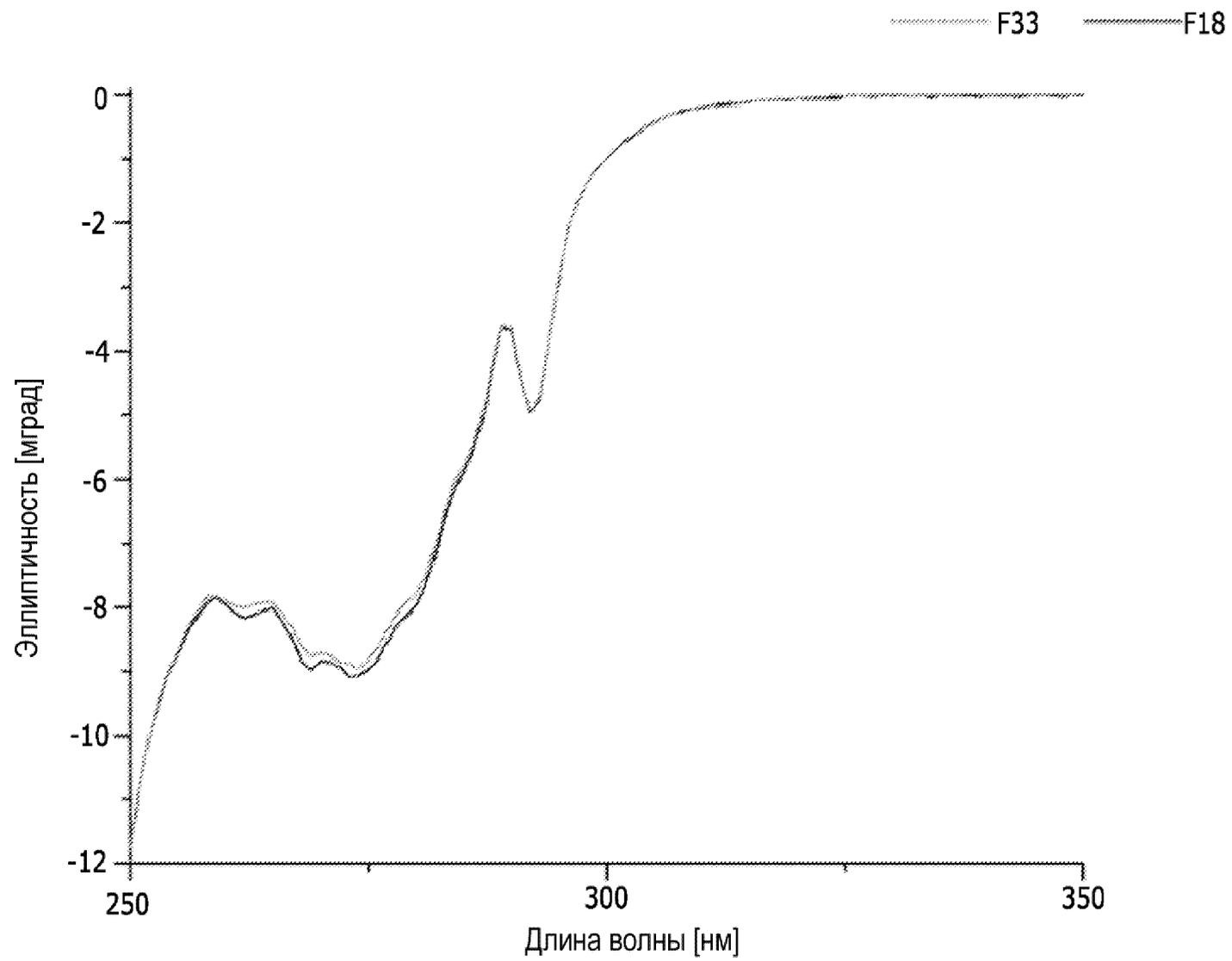




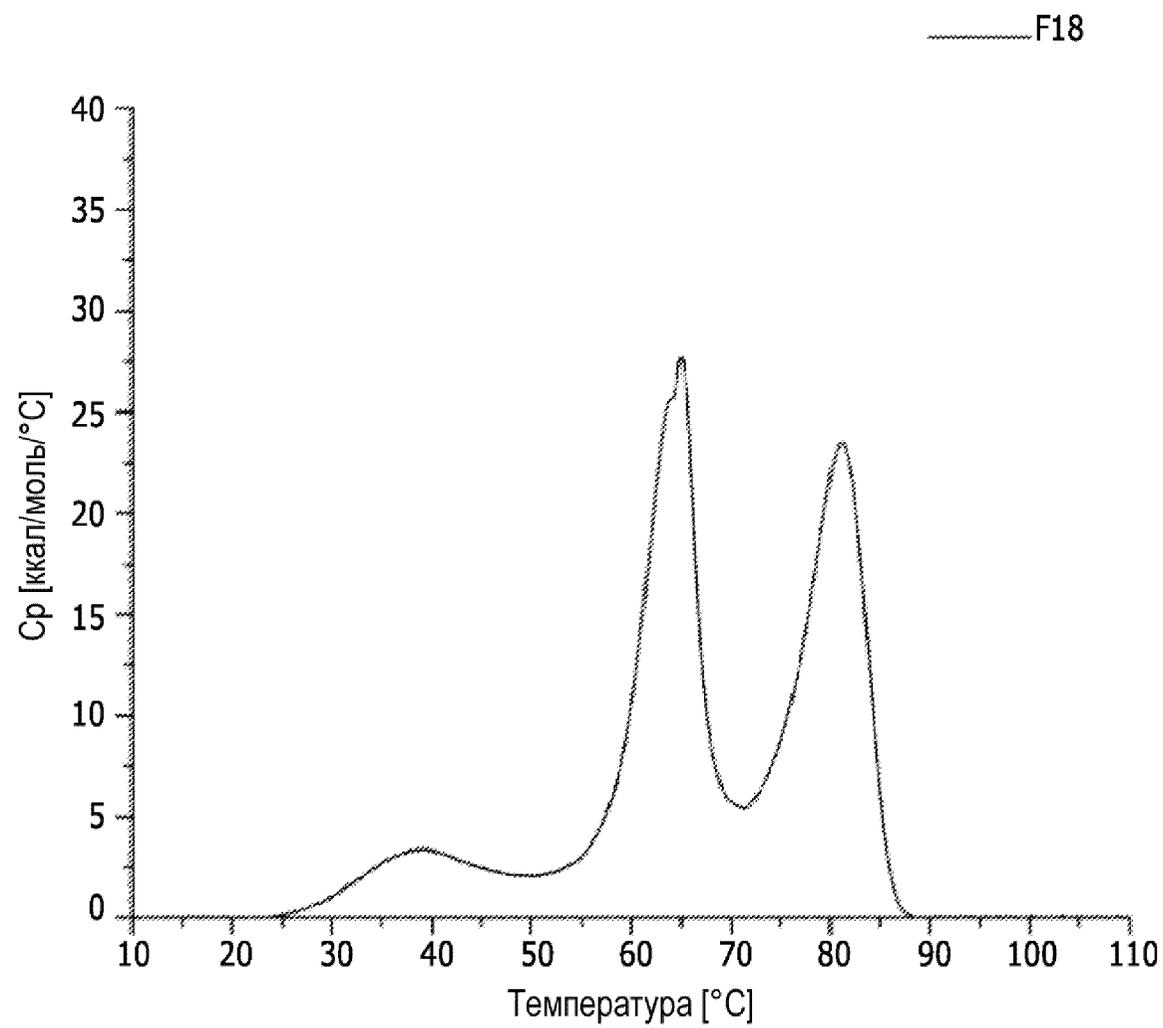
Фиг. 24



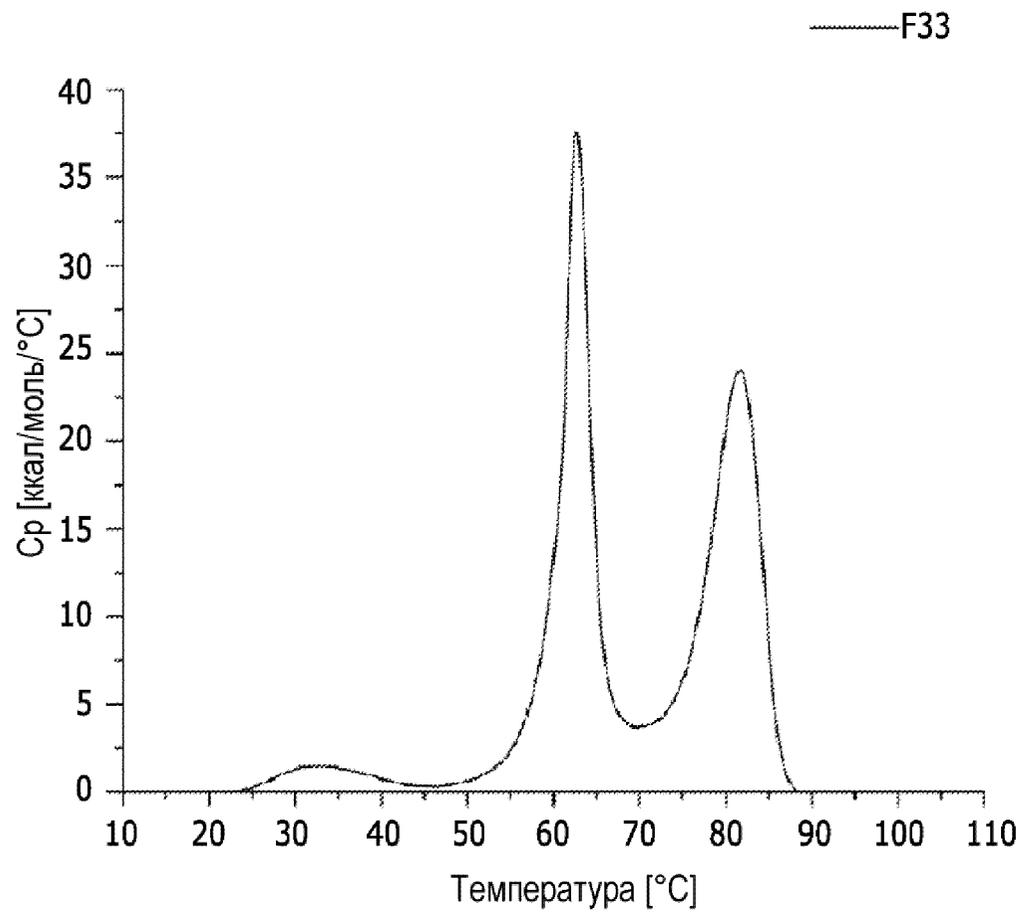
Фиг. 25



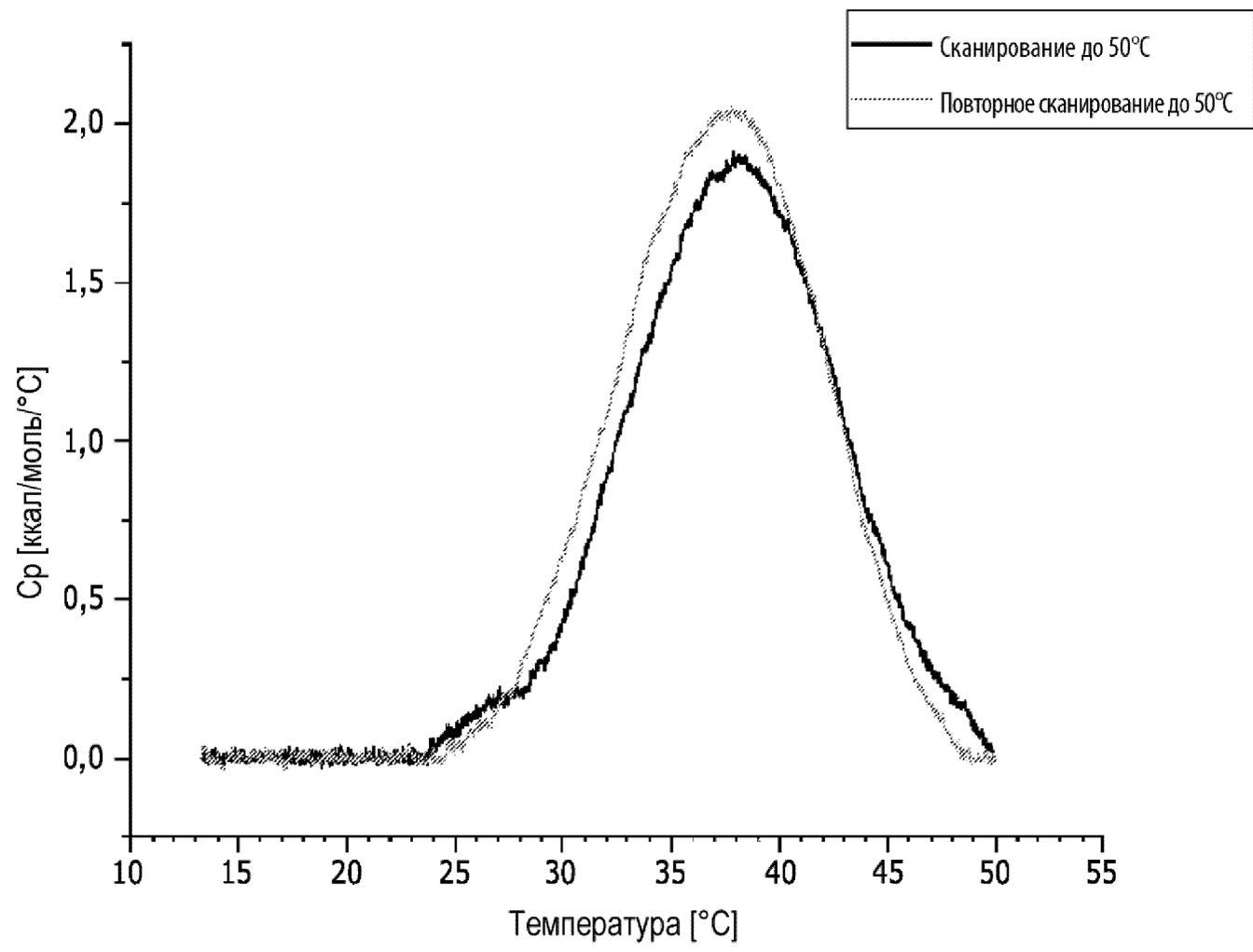
Фиг. 26



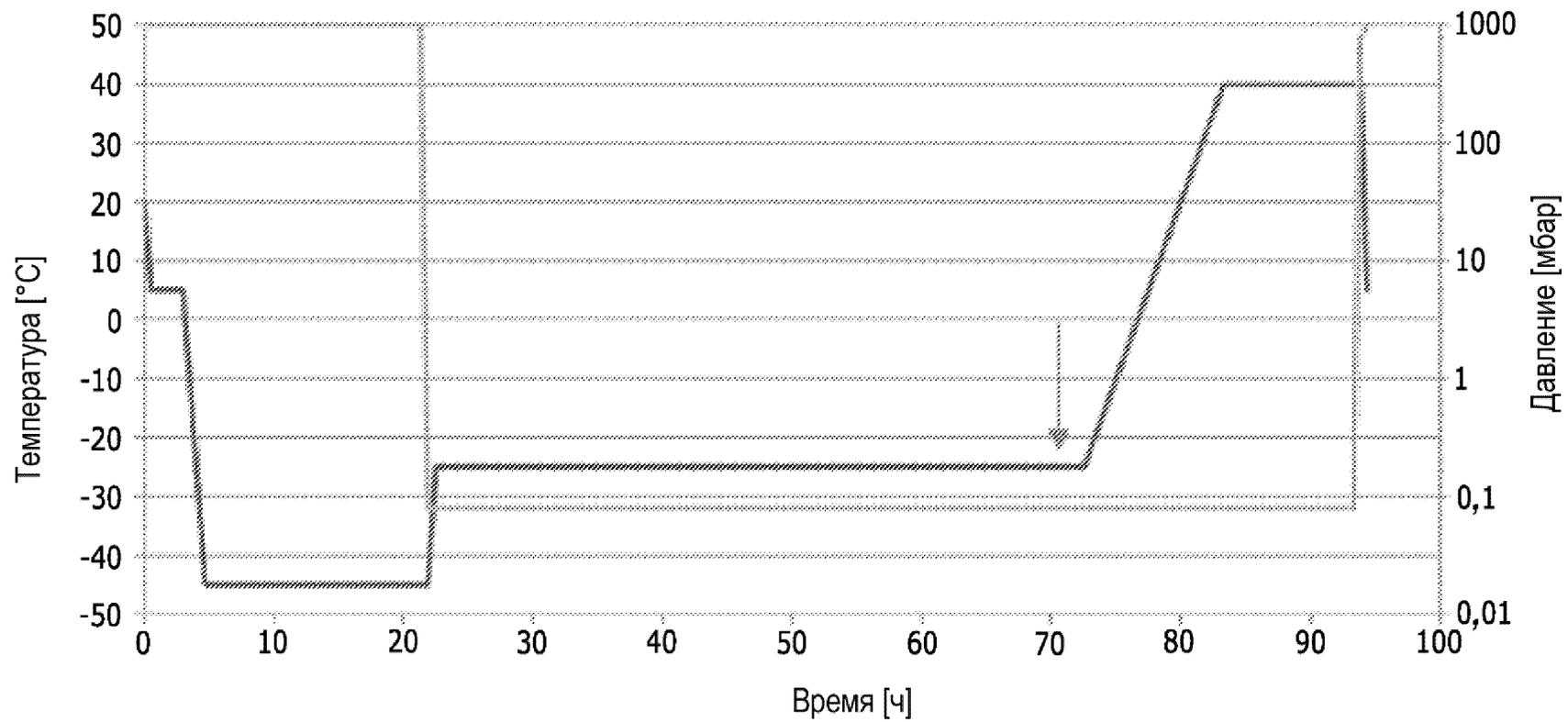
Фиг. 27А



Фиг. 27В



Фиг. 28

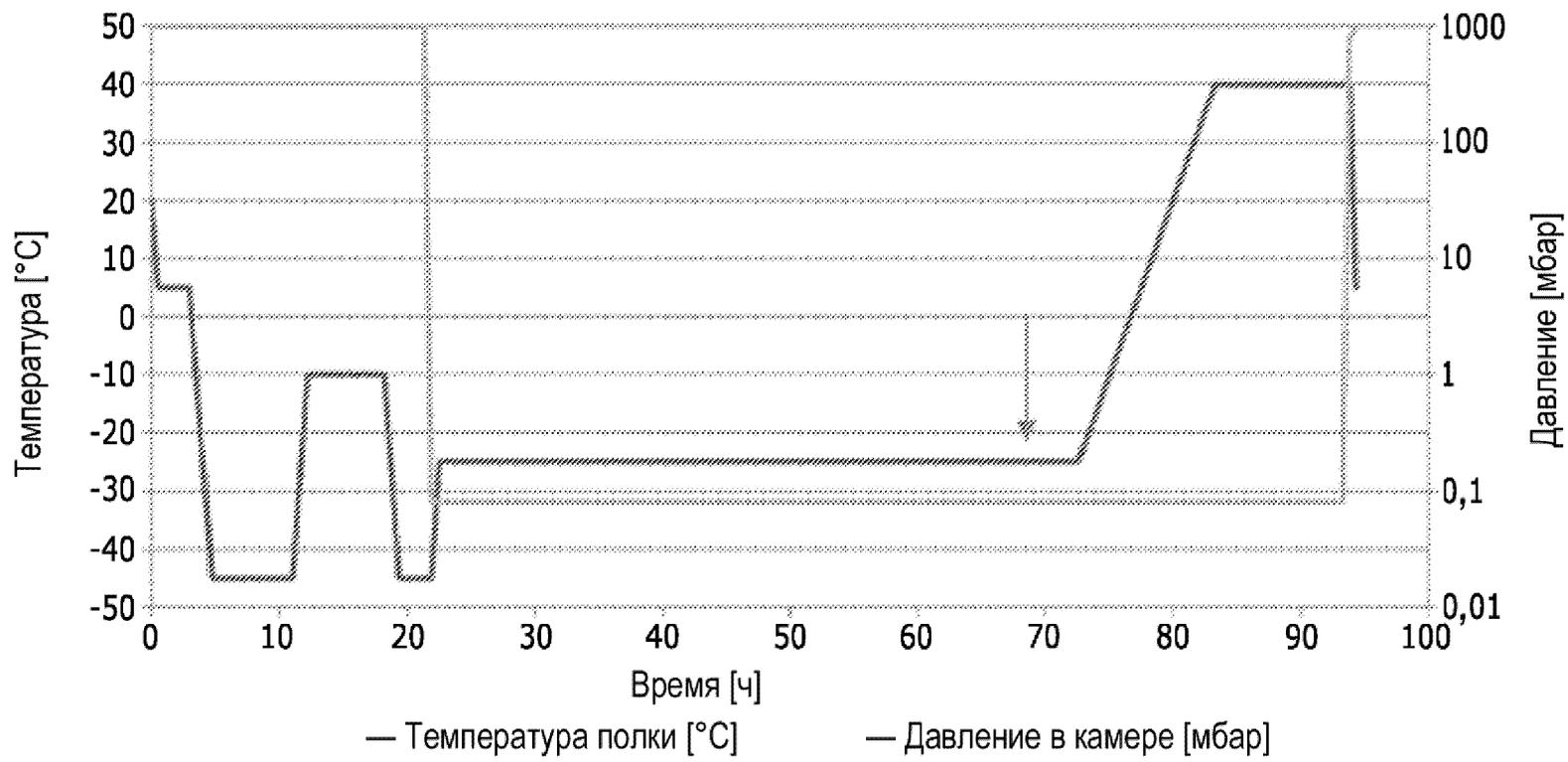


- Температура полки

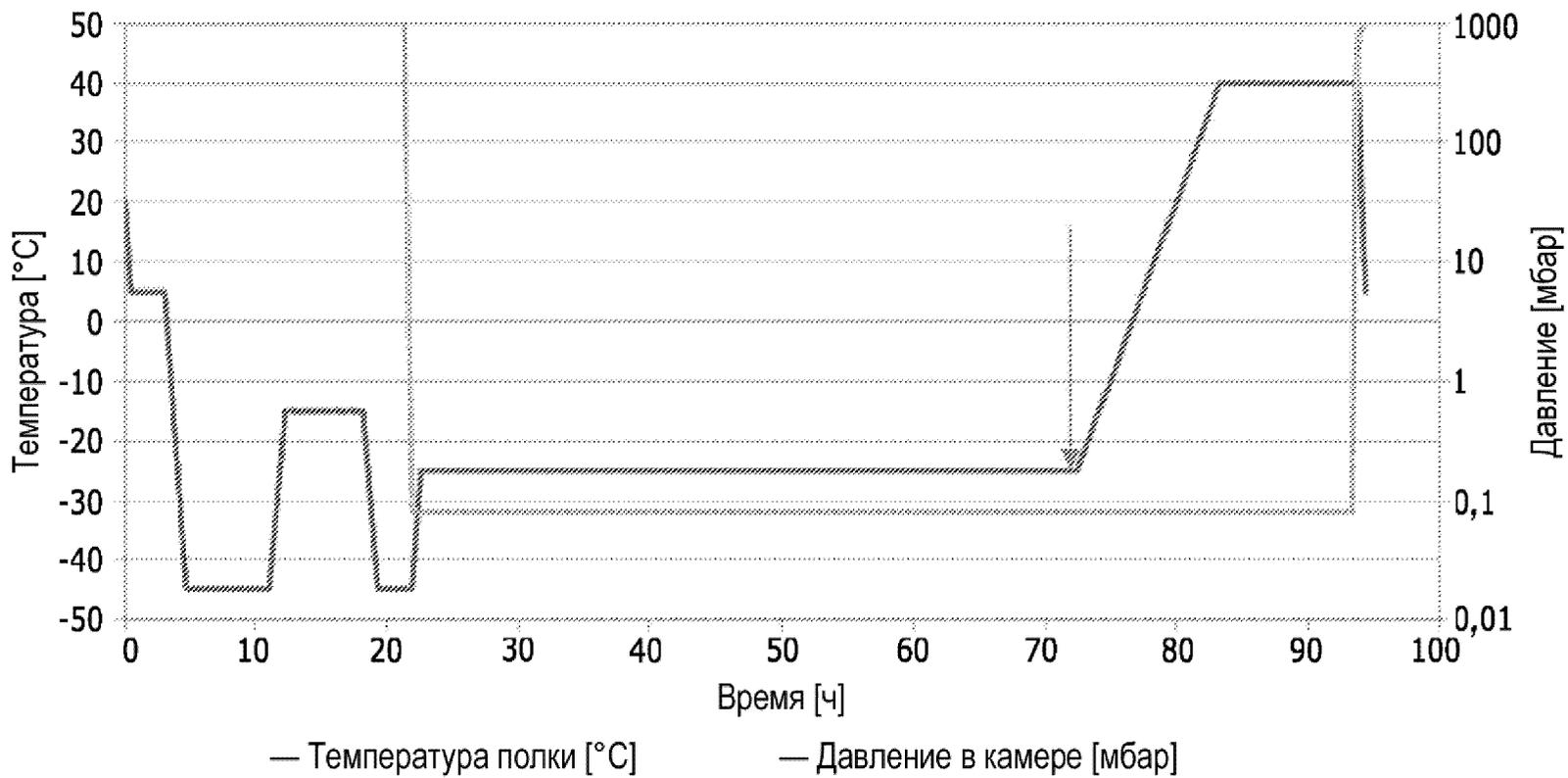
- Давление

Фиг. 29

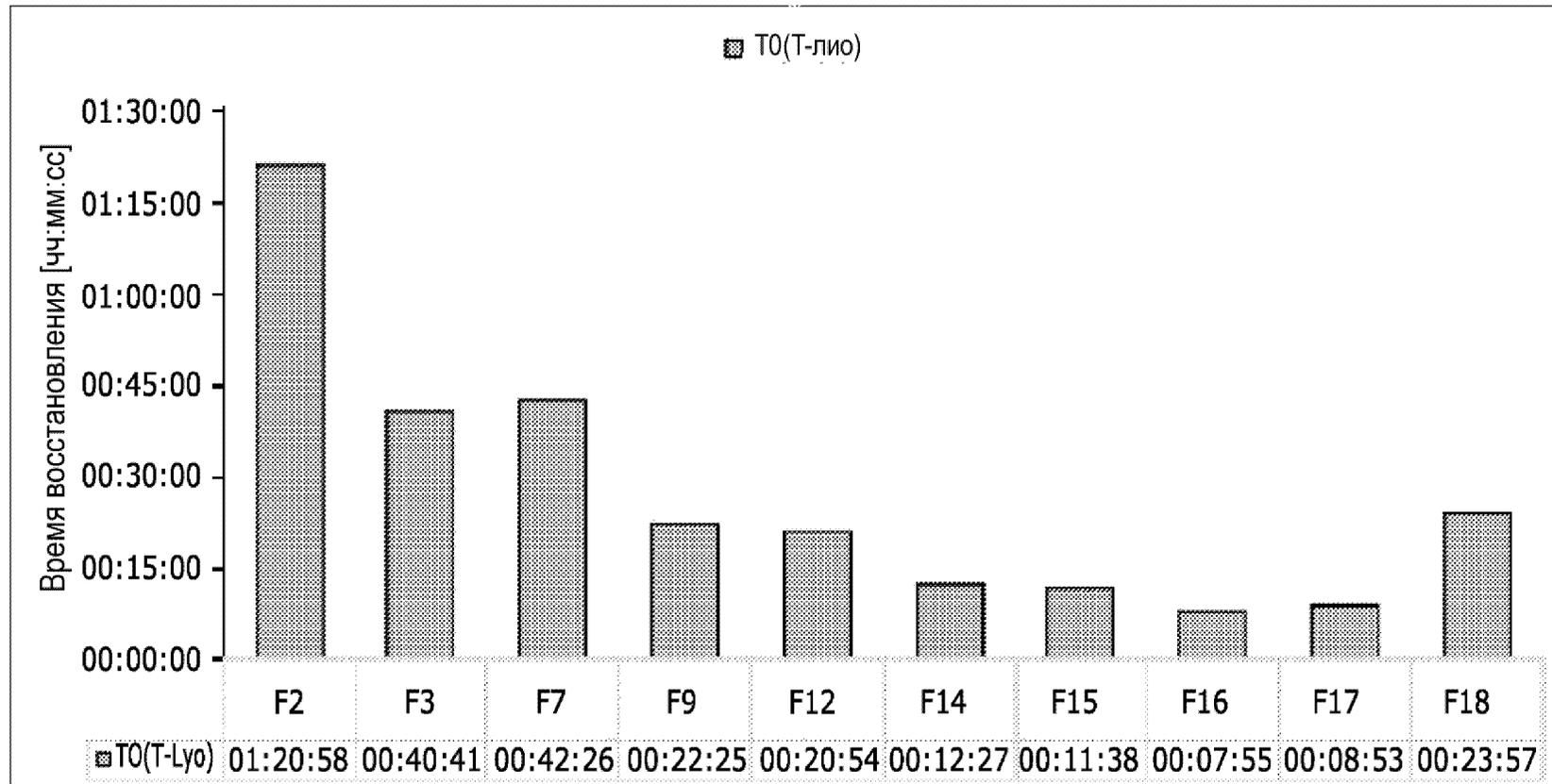
36/50



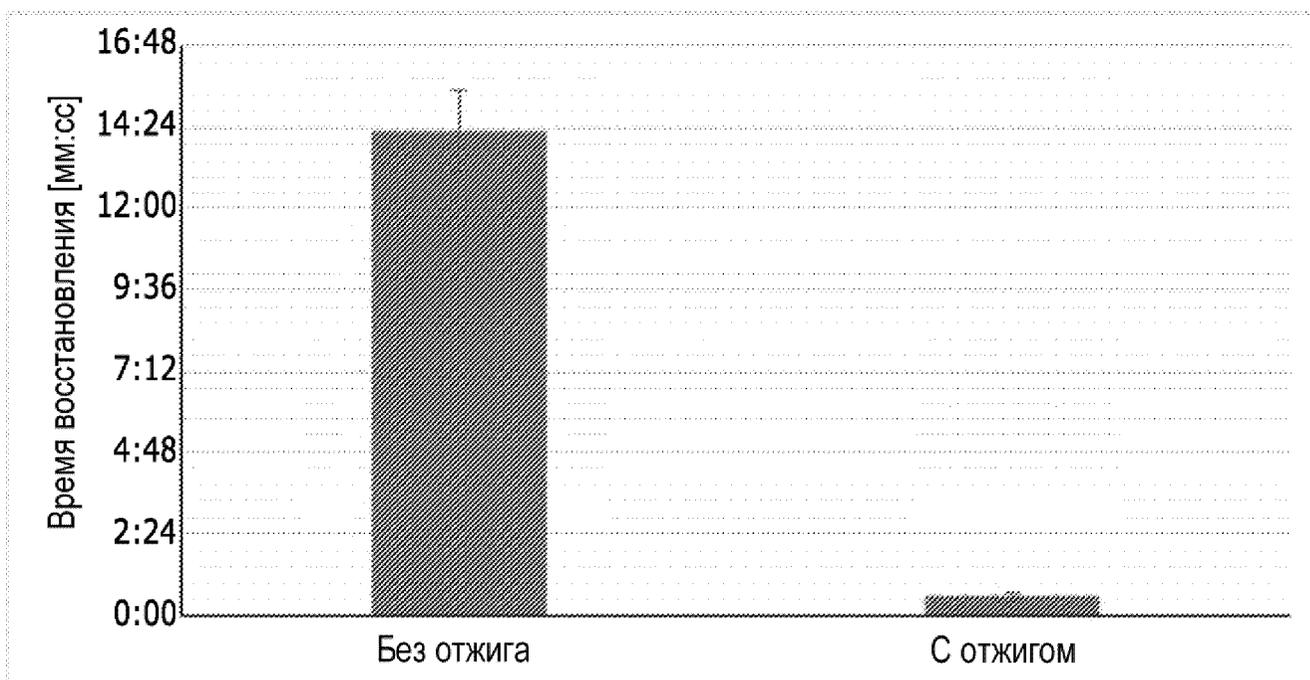
Фиг. 30А



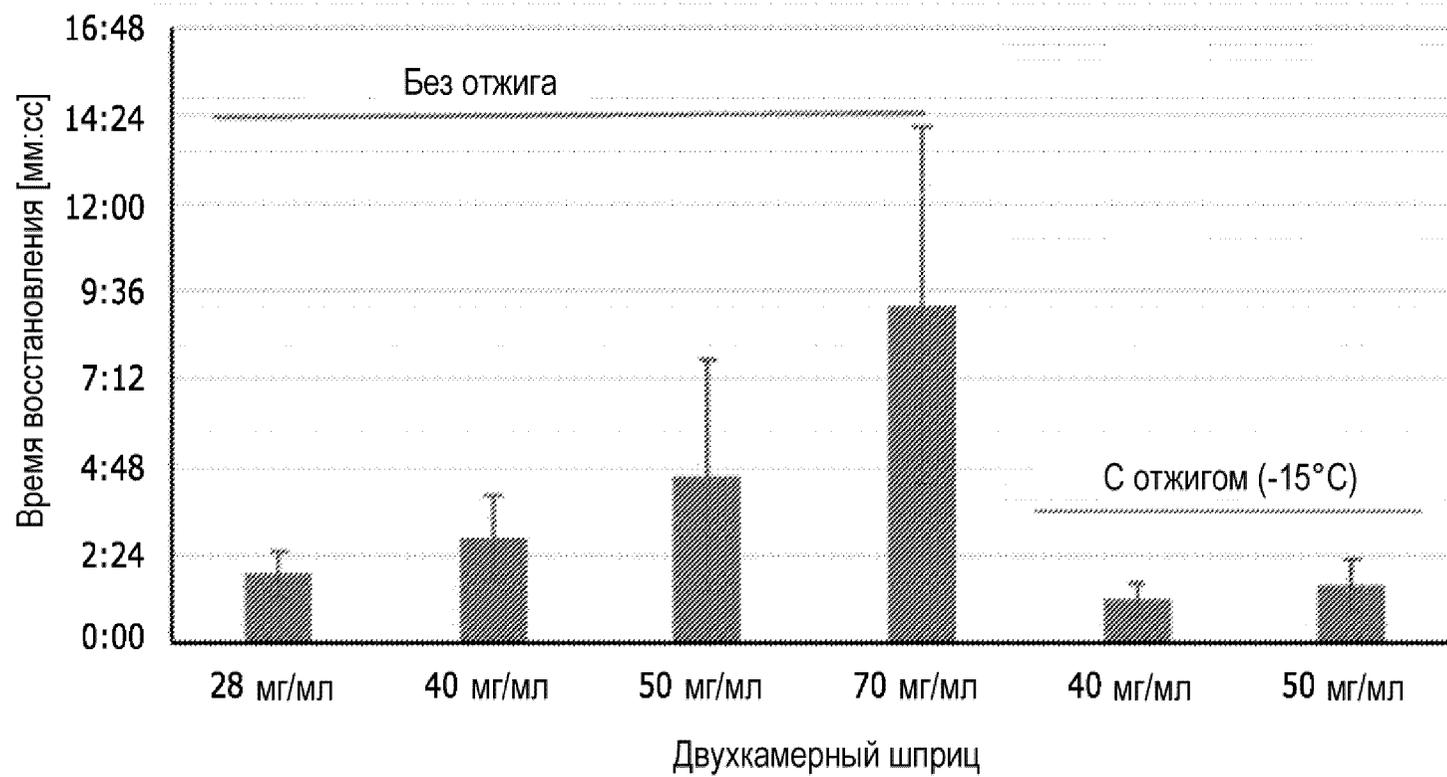
Фиг. 30В



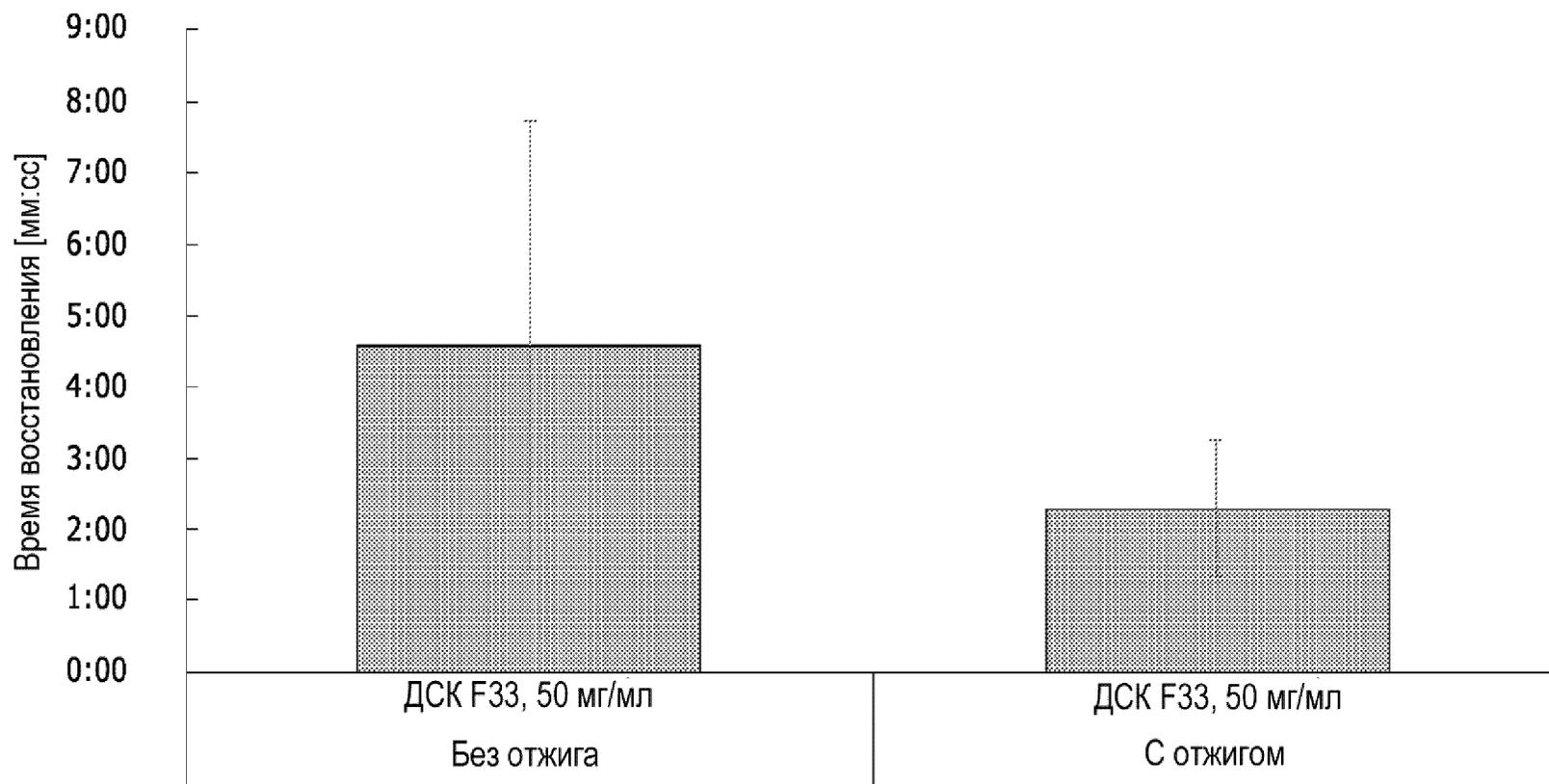
Фиг. 31



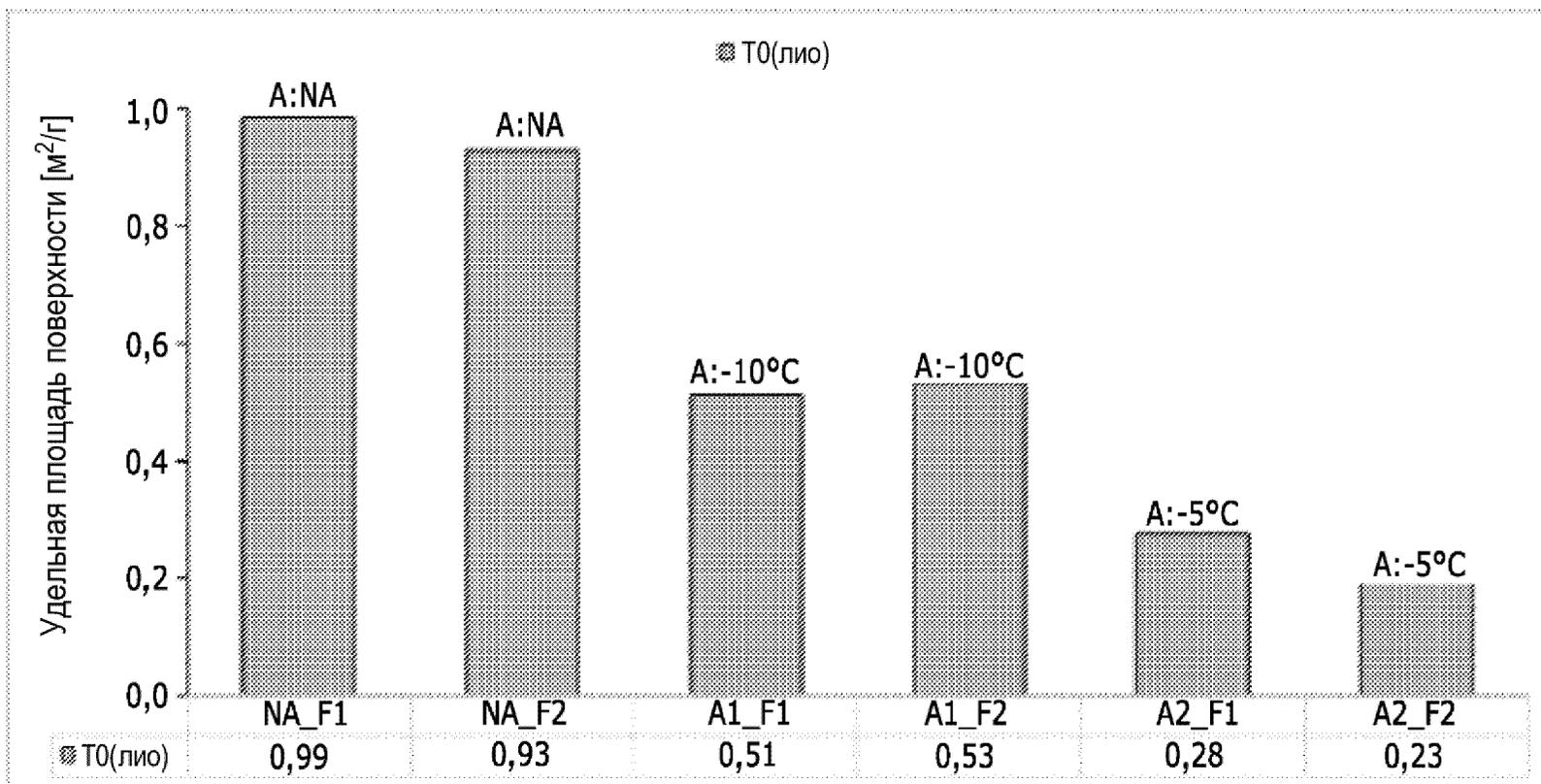
Фиг. 32



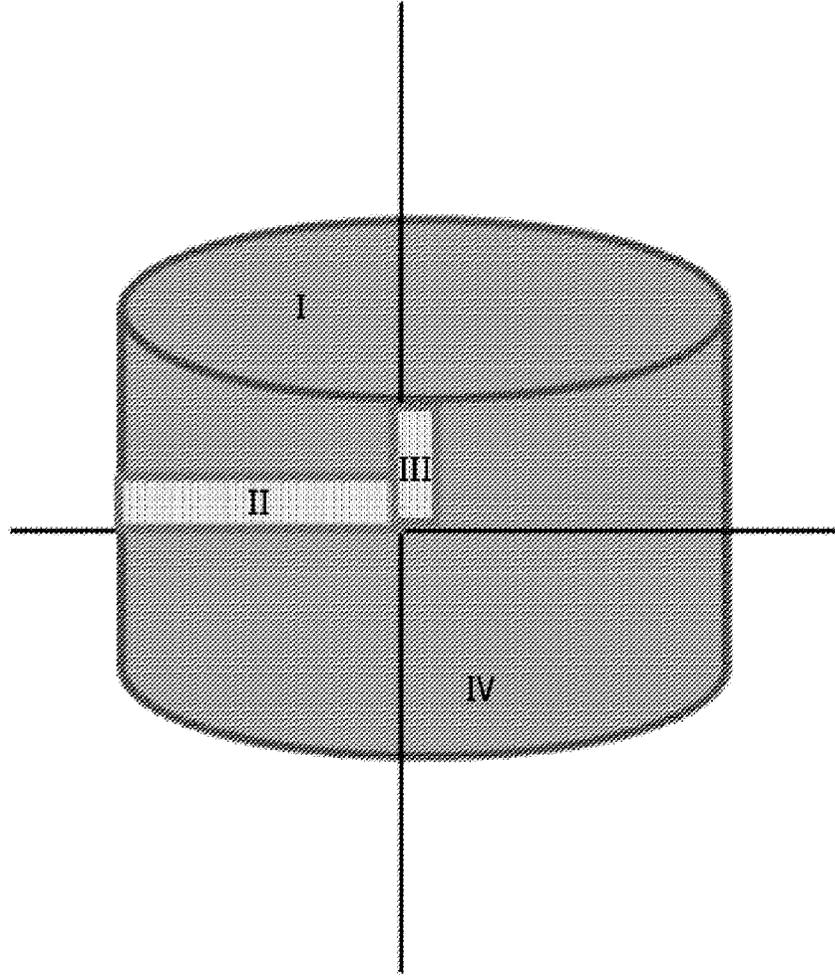
Фиг. 33А



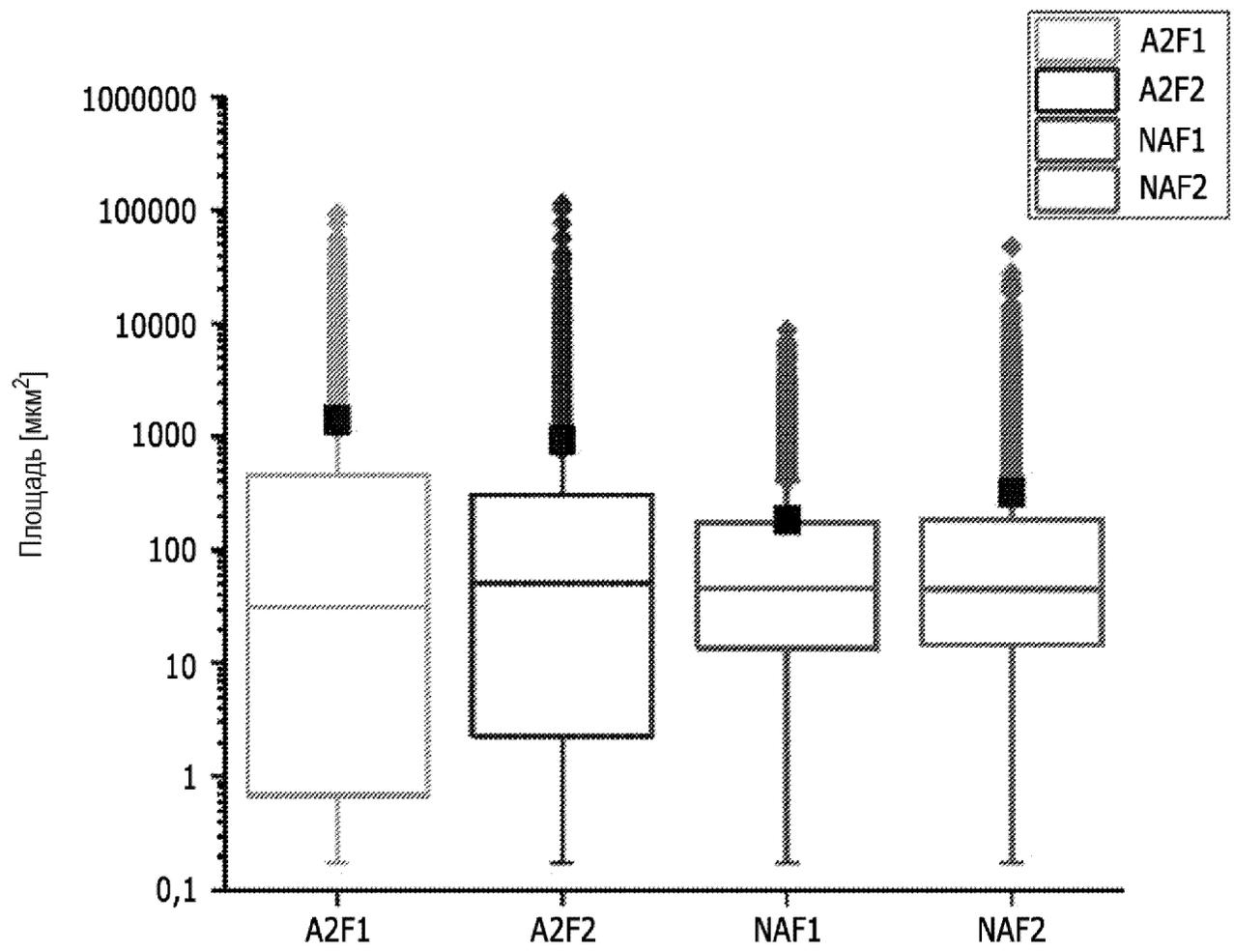
Фиг. 33В



Фиг. 34

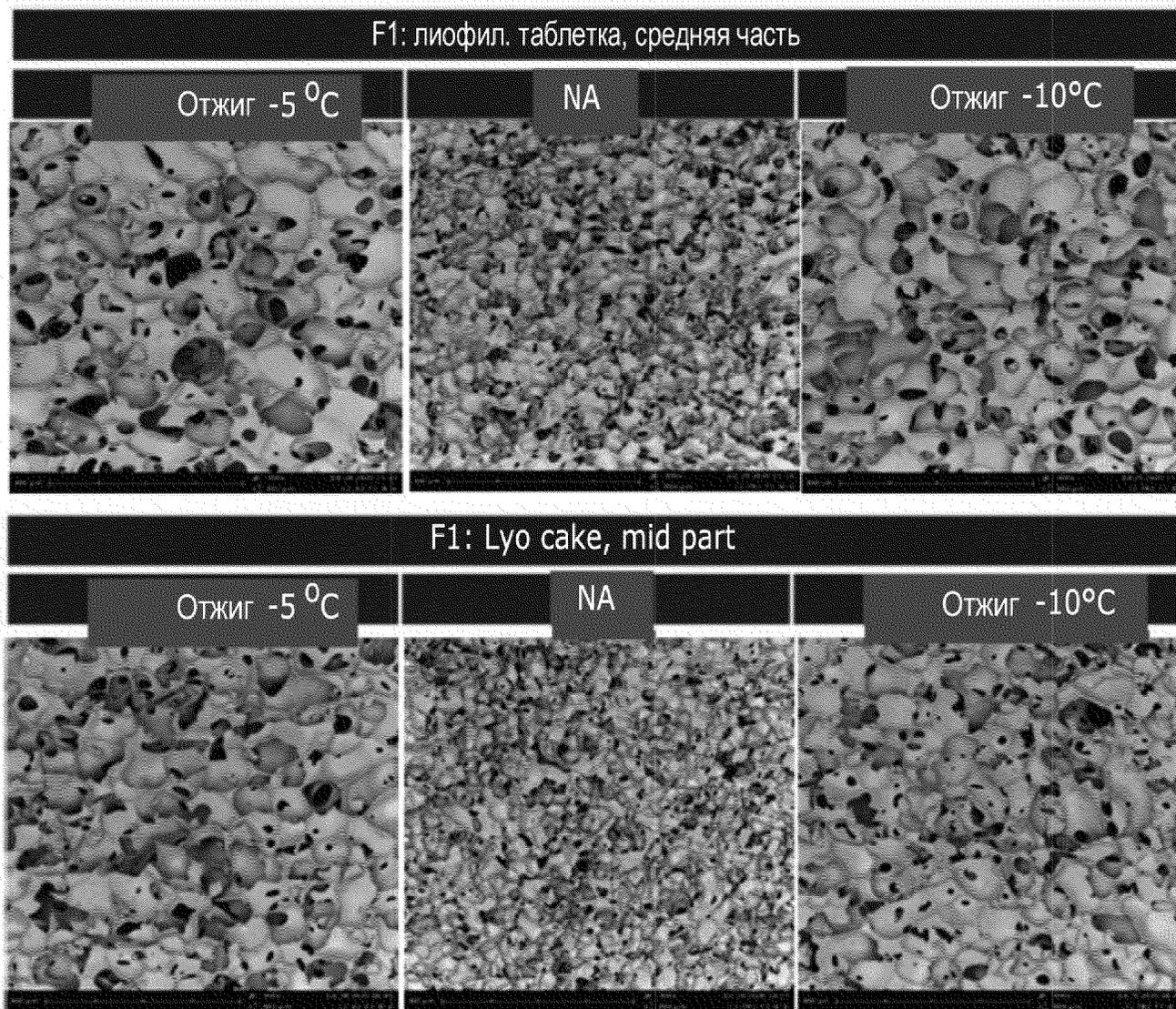


Фиг. 35



F1 и F2 = состав F33 при концентрации белка 50 мг/мл и 28 мг/мл соответственно
 A2 = сухая заморозка с этапом отжига (A2)
 NA = сухая заморозка без этапа отжига (NA)

Фиг. 36



Фиг. 37

Тест ²	F15						
	T0 (лио)	T3M	T6M	T9M	T12M	T0 (лю)	T3M
Концентрация белка (мг/мл)	98,9	102,3	100,9	н.п.	99,8	101,2	103,8
pH	7,4	7,5	7,4	н.п.	7,4	7,4	7,5
АО-ВЭЖХ (основной пик) (%)	59,4	56,7	57,5	54,1	57,9	59,4	57,3
АО-ВЭЖХ (пре-пики) (%)	7,3	9,2	7,8	12,6	8,0	7,1	8,9
АО-ВЭЖХ (пост-пики) (%)	33,2	34,1	34,7	33,4	34,1	33,5	33,8
ЭХ-ВЭЖХ (основной пик) (%)	90,0	89,5	89,5	88,5	90,2	88,5	88,1
ЭХ-ВЭЖХ (ВММ) (%)	3,4	3,2	3,2	3,7	2,9	4,7	4,3
ЭХ-ВЭЖХ (димер) (%)	6,5	7,1	7,2	7,8	6,7	6,7	7,4
ЭХ-ВЭЖХ (НММ) (%)	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1
ОФ-ВЭЖХ (основной пик) (%)	82,0	81,7	81,5	80,9	81,6	81,6	81,7
ОФ-ВЭЖХ (пре-пик) (%)	7,2	7,5	7,8	8,1	6,9	7,1	7,0
ОФ-ВЭЖХ (пост-пик) (%)	10,8	10,7	10,7	11,1	11,6	11,3	11,3
КЭ-ДСН (восстанавливающий) (основной пик) (%)	91,1	91,4	91,7	н.п.	89,9	91,4	91,4
КЭ-ДСН (восстанавливающий) (пре-пики) (%)	7,1	6,6	6,2	н.п.	5,9	7,0	6,7
КЭ-ДСН (восстанавливающий) (пост-пики) (%)	1,8	2,0	2,1	н.п.	4,2	1,6	1,9
КЭ-ДСН (невосстанавливающий) (основной пик) (%)	89,7	88,3	87,9	87,0	88,8	89,8	88,0
КЭ-ДСН (невосстанавливающий) (пре-пики) (%)	9,3	10,0	10,6	7,9	7,6	9,3	10,1
КЭ-ДСН (невосстанавливающий) (пост-пики) (%)	1,0	1,7	1,5	5,1	3,6	0,9	1,9
Относительная активность (клеточный биоанализ) (%)	105%	110%	85%	89%	88%	75%	116%
Частицы, невидимые невооруженным глазом (СИФ) ¹	2 255	13 027	6 036	н.п.	9 464	18 398	24 576
Частицы ≥ 2 мкм	177	1 548	975		997	1 498	3 188
Частицы ≥ 10 мкм	7	311	247		198	389	424
Частицы ≥ 25 мкм							
ОСВ (%)	0,1	0,1	0,1	н.п.	0,2	0,1	0,1
Время восстановления [мин:с]	11:38	14:28	14:13	25:02	33:37	07:55	08:25

АО-ВЭЖХ = анионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография; КЭ-ДСН = капиллярный электрофорез с додецил-сульфатом натрия; ВММ = высокая молекулярная масса; НММ = низкая молекулярная масса; НИ = не исследовано; НД = не применимо; ОФ-ВЭЖХ = обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ЭХ-ВЭЖХ = эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография; ОСВ = остаточное содержание влаги;

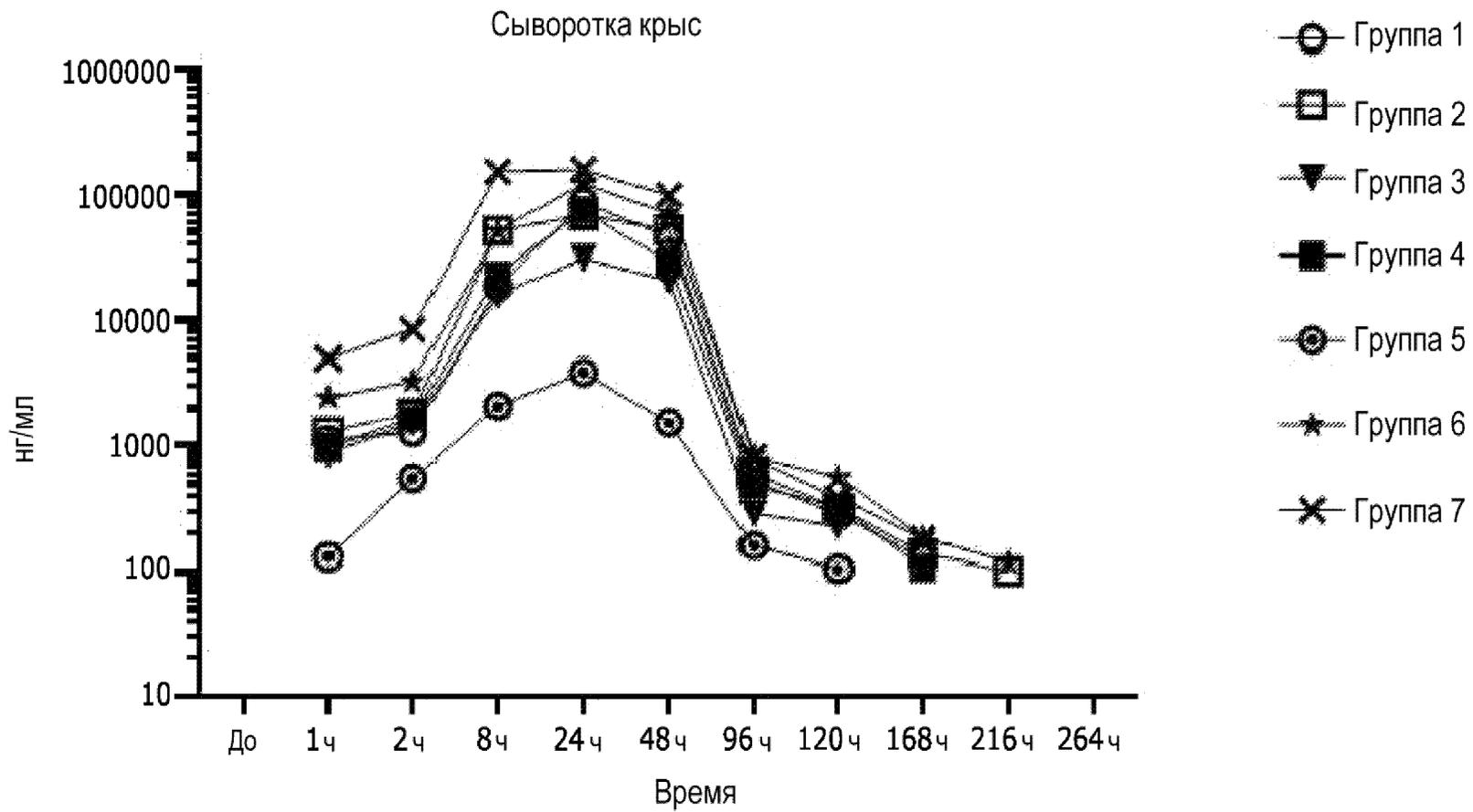
¹Измерения СИФ: F15-17 разводили до 30 мг/мл и корректировали данные по коэффициенту разведения; F33 не разводили

²Следующие дополнительные аналитические способы проводили без существенных изменений на протяжении исследования стабильности F15-F17 (данные не приведены):

F16			F17					F33			
T6M	T9M	T12M	T0 (Iyo)	T3M	T6M	T9M	T12M	T0 (Iyo)	T3M	T6M	T14M
104,1	н.п.	101,4	102,8	105,3	102,2	н.п.	101,3	69,4	67,5	72,4	н.п.
7,5	н.п.	7,4	7,7	7,8	7,7	н.п.	7,8	7,3	7,3	7,2	н.п.
57,6	55,6	58,1	59,9	58,2	57,9	56,1	59,1	61,9	63,5	63,4	62,5
7,5	10,6	7,2	6,9	8,3	7,1	10,3	7,1	8,4	7,7	8,4	7,8
34,9	33,8	34,7	33,3	33,5	35,0	33,5	33,8	29,8	28,8	28,3	29,8
88,6	87,3	89,1	89,7	89,7	89,9	88,8	90,6	93,2	93,1	94,0	92,7
4,1	4,8	3,9	4,0	3,5	3,3	4,0	3,1	2,7	2,7	2,3	2,5
7,2	7,9	6,7	6,2	6,7	6,6	7,1	6,1	3,9	4,2	3,5	4,8
0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1
81,7	81,5	81,4	83,0	82,8	82,4	82,6	82,9	84,1	84,9	83,9	83,8
7,4	7,6	6,7	7,2	7,2	7,8	7,4	6,8	8,4	7,5	8,2	8,1
10,8	11,0	11,8	9,9	10,1	9,8	9,9	10,3	7,4	7,6	7,9	8,1
92,2		90,5	91,6	92,0	92,0		90,5	н.п.			
6,0	н.п.	6,1	7,0	6,2	6,4	н.п.	6,2				
1,9		3,4	1,5	1,8	1,7		3,3				
88,1	87,6	89,5	89,9	88,8	88,3	89,1	89,5	89,3	н.п.		90,8
10,5	8,1	7,8	9,0	9,7	10,4	7,2	9,2	10,7			9,2
1,4	4,2	2,7	1,1	1,5	1,3	3,7	1,3	0,0			0,0
74%	85%	82%	111%	97%	68%	85%	88%	86%	97%	90%	91%
8 757	н.п.	4 693	1 541	24 470	16 971	н.п.	8 171	9 905	984	327	1 172
1 039		459	155	3 089	2 382		884	1 106	73	15	64
233		85	28	643	481		240	176	15	0	9
0,1	н.п.	0,2	0,0	0,1	0,1	н.п.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4
14:11	19:08	07:10	08:53	08:24	12:51	21:29	14:15	14:18 ± 01:12	11:07 ± 05:56	10:22 ± 02:19	04:43 ± 00:31

Внешний вид ОП₃₅₀, ОП₅₅₀, T_{начало агрег.}, T_m, агрег., T_m, T_g и XRD. Для F33 не было выявлено больших изменений при применении следующих аналитических способов: внешний вид, мутность и цвет.

Фиг. 38 (Продолжение)



Фиг. 39

Группа	Tмакс	Cмакс	Cмакс_Д	ППКпосл.	ППКпосл._Д	Tпосл.	ППКбеск._набл.
	(ч)	(нг/мл)	(кг*нг/мл/мг)	(ч*нг/мл)	(ч*кг*нг/мл/мг)	(ч)	(ч*нг/мл)
1	48	88100	881	3320000	33200	192	3320000
2	48	91100	911	3550000	35500	192	3560000
3	48	31400	314	1320000	13200	144	1320000
4	48	75800	758	2380000	23800	192	2380000
5	48	3890	38.9	142000	1420	144	143000
6	48	126000	1260	4900000	49000	240	4900000
7	48	161000	1610	7100000	71000	192	7100000

50/50

Фиг. 40