



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114289** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

| | | | |
|--|--------------------------------------|--|--|
| (21) Номер заявки: | а 2013 11856 | (72) Винахідник(и): | Дай Вейго (US), |
| (22) Дата подання заявки: | 30.09.2011 | | Хілл Бет (US), |
| (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: | 25.05.2017 | | Лю Куй (US), |
| (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 13/043,925 | | Мечковскі Карл (US) |
| (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: | 09.03.2011 | (73) Власник(и): | ЯНССЕН БАЙОТЕК, ІНК., |
| (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: | US | | 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA |
| (41) Публікація відомостей про заявку: | 10.01.2014, Бюл.№ 1 | (74) Представник: | Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115 |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 25.05.2017, Бюл.№ 10 | (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: | US 2009/0022727 A1, 22.01.2009 |
| (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ | PCT/US2011/054257, 30.09.2011 | | US 2006/141040 A1, 29.06.2006 |
| | | | US 2006/0121115 A1, 08.06.2006 |
| | | | US 2009/0208492 A1, 20.08.2009 |

(54) НЕВОДНІ КОНЦЕНТРОВАНІ СУСПЕНЗІЙНІ КОМПОЗИЦІЇ ЗІ ЗНИЖЕНОЮ В'ЯЗКІСТЮ НА ОСНОВІ АНТИТІЛ

(57) Реферат:

Даний винахід стосується неводної суспензійної композиції високої концентрації, що складається з:

- а) несучого середовища, що містить кунжутну олію як гідрофобний засіб і етилолеат як засіб, який знижує в'язкість; і
- б) антитіла в суміші з ексципієнтом, де антитілом є антитіло проти ФНО- α , яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) з SEQ ID NO: 7 (VH) і варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 4.

UA 114289 C2

Галузь застосування винаходу

Даний винахід стосується неводних концентрованих суспензійних композицій зі зниженою в'язкістю антитіл і способів їх одержання і використання.

Передумови створення винаходу

Моноклональні антитіла (mAb) стали важливими засобами білкової терапії для лікування різних захворювань людини, таких як рак, інфекційні захворювання, запалення і аутоімунні захворювання. У цей час більше 20 продуктів на основі моноклональних антитіл одержали схвалення Управління з контролю харчових продуктів і лікарських засобів США (FDA), і приблизно 20 % всіх засобів, що тестуються на сьогоднішній день в клінічних випробуваннях біофармацевтичних засобів являють собою моноклональні антитіла (Daugherty et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 58:686-706, 2006).

Антитіла можна вводити, наприклад, парентеральним способом, таким як внутрішньовенна (IV), підшкірна (SC) або внутрішньом'язова (IM) ін'єкція. Підшкірний і внутрішньом'язовий способи введення знижують вартість процедури і підвищують зручність для пацієнтів і медпрацівників при введенні препарату. Щоб бути ефективними і фармацевтично прийнятними, композиції для парентерального введення переважно повинні бути стерильними, стабільними, повинні легко набиратися в шприц і вводитися через голку, а також не повинні спричиняти подразнення. Перераховані характеристики приводять до таких вимог до виробництва, зберігання і використання композицій для ін'єкційного введення, які ускладнюють розробку відповідних дозованих форм, зокрема для композицій з високою концентрацією білка.

Як і для будь-яких білкових терапевтичних засобів, для антитіл характерна фізична і хімічна нестабільність, така як агрегація, денатурація, поперечне зшивання, деамідування, ізомеризація, окиснення і розпад на фрагменти меншого розміру (Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007). Таким чином, особливе значення для розробки комерційно життєздатних фармацевтичних препаратів на основі антитіл набуває розробка композицій для виявлення критичних факторів стабільності антитіл.

Додаткові труднощі при виготовленні композицій створює необхідний малий об'єм (звичайно 0,5-2 мл) дозованих форм для підшкірного або внутрішньом'язового введення, оскільки для досягнення терапевтичних рівнів активного засобу у пацієнта необхідні композиції на основі антитіл з високою концентрацією, звичайно від 100 мг до 1 г білка на одиницю дозування. Білкові композиції високої концентрації нерідко приводять до підвищеної агрегації білка, незадовільної стабільності та підвищеної в'язкості композиції, що негативно позначається на характеристиках ін'єкційного введення і призводить до небажаних наслідків при обробці, виготовленні і зберіганні композицій (Shire et al., J. Pharm. Sci. 93:1390-1402, 2004).

Використовувані в даний час комерційно доступні продукти на основі моноклональних антитіл для підшкірного або внутрішньом'язового введення звичайно вводять в композицію у водному буферному розчині, такому як фосфатний або L-гістидиновий буферний розчин, з введенням ексципієнтів або поверхнево-активних речовин (ПАР), таких як маніт, сахароза або полісорбат 80, для запобігання агрегації і поліпшення стабільності складу. Опубліковані концентрації антитіл у водних композиціях досягають 100 мг/мл (Wang et al., J. Pharm. Sci. 96:1-26, 2007). В'язкість водних композицій знижували додаванням солей (патент США № 7666413) або органічних або неорганічних кислот (патент США № 7740842).

Описані також неводні композиції на основі антитіл або білків. У публікації WO2006/071693 описане використання неводної суспензії моноклонального антитіла з досягненням концентрації до 100 мг/мл моноклонального антитіла в складі композиції, що містить модифікатор в'язкості (полівінілпіролідон, ПВП) і розчинник (бензилбензоат (BB) або PEG400). У публікації WO2004/089335 описане використання неводної суспензії лізозиму з досягненням концентрації приблизно 100 мг/мл в складі композицій, що містять ПВП, глікофуrol (GF), BB, бензиловий спирт (BA) або PEG400. У публікації US2008/0226689A1 описані однофазні неводні в'язкі композиції на основі трикомпонентного несучого середовища (полімер, ПАР і розчинник), що містять 100 мг/мл гормону росту людини (hGH). У патенті США № 6730328 описані неводні гідрофобні неполярні несучі середовища з низькою реакційною здатністю (такі як перфтордекалін) для приготування білкових композицій. Такі композиції не є оптимальними в силу, наприклад, своєї високої в'язкості, що ускладнює їх обробку, виготовлення і ін'єкційне введення, присутність в складі композиції несучого середовища з декількох компонентів, а також потенційних юридичних труднощів, пов'язаних з використанням ще не схвалених до застосування полімерів.

Таким чином, є потреба в розробці поліпшених неводних композицій високої концентрації.

Короткий опис фігур

Фіг. 1. Стабільність суспензійних композицій mAb проти ФНО-α при зберіганні протягом 1

тижня і 4 тижнів при температурі +40 °С. Концентрації антитіл для кожної композиції вказані у % ваг. (% в/в).

Фіг. 2. Зусилля ін'єкції (Н) композицій зменшується зі збільшенням кількості засобу, який знижує в'язкість, в композиції. А. Композиції на основі БСА; В. Композиції на основі mAb проти ФНО-α.

Фіг. 3. Зусилля ін'єкції і в'язкість збільшуються при збільшенні концентрації А. і В. mAb проти ФНО-α і С. концентрації БСА в композиції.

Фіг. 4. Кореляція між зусиллям ін'єкції і в'язкістю композицій на основі mAb проти ФНО-α. А. Композиції з 20 % mAb проти ФНО-α; В. Всі вивчені композиції на основі mAb проти ФНО-α.

Фіг. 5. Залежність зусилля ін'єкції від концентрації білка і розміру частинок в композиції. Несуче середовище: етилолеат (ЕО)/кунжутна олія (СО)/50/50.

Фіг. 6. А. Збільшення швидкості зсуву може приводити до зниження в'язкості білкових концентрованих композицій. В. Вибір несучого середовища впливає на залежність в'язкості від швидкості зсуву. С. Концентрація білка впливає на залежність в'язкості від швидкості зсуву. Композиції mAb проти ФНО-α ЕО/СО/50/50.

Фіг. 7. Вплив швидкості ін'єкції на зусилля ін'єкції. А. Частинки БСА при різній концентрації в композиціях; В. Частинки БСА різних розмірів в несучому середовищі ЕО; С. Різні концентрації mAb проти ФНО-α в несучому середовищі ЕО/СО/50/50.

Фіг. 8. Стабільність композицій на основі CNTO148 при А) розпилювальному сушінні і при 100 мг/мл суспензії і В) при 100 мг/мл і 200 мг/мл суспензії при температурі 25 °С за результатами вимірювання з використанням ексклюзійної ВЕРХ. НО = суспензію не обробляли окисом алюмінію. Комп-1, Комп-5 і Комп-7 - висушені розпиленням композиції з експерименту SD_1 в таблиці 7. СО/ЕО=ЕО/СО/50/50.

Фіг. 9. Стабільність композицій на основі CNTO148 при А) розпилювальному сушінні і при 100 мг/мл суспензії і В) при 100 мг/мл і 200 мг/мл суспензії при температурі 40 °С за результатами вимірювання з використанням ексклюзійної ВЕРХ. НО = суспензію не обробляли окисом алюмінію. Комп-1, Комп-5 і Комп-7 - висушені розпиленням композиції з експерименту SD_1 в таблиці 7. СО/ЕО=ЕО/СО/50/50. SD = висушений розпиленням.

Фіг. 10. Процентна частка біологічної активності для висушеної розпиленням композиції Комп-1 на основі CNTO148 з експерименту SD_1 в таблиці 7 і композиції Комп-1 з 100 мг/мл суспензії. SD = висушений розпиленням. СО/ЕО=ЕО/СО/50/50.

Фіг. 11. Спектри кругового дихроїзму в далекій УФ зоні для висушеної розпиленням композиції Комп-1 на основі CNTO148 з експерименту SD_1 в таблиці 7 і композиції Комп-1 зі 100 мг/мл суспензії, зібрані при температурі 25 °С. SD = висушений розпиленням. СО/ЕО=ЕО/СО/50/50.

Фіг. 12. А) Послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіл проти ФНО-α TVN14 (SEQ ID NO:1), TVN15 (SEQ ID NO:2), TVN148 (SEQ ID NO:3), TVN148B (SEQ ID NO:4) і TVN196 (SEQ ID NO: 5) і В) послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіл проти ФНО-α TVN14 (SEQ ID NO:6), TVN15 (SEQ ID NO:6), TVN148 (SEQ ID NO:7), TVN148B (SEQ ID NO:7) і TVN196 (SEQ ID NO: 7).

Виклад суті винаходу

Один варіант здійснення даного винаходу являє собою неводну концентровану суспензійну композицію, що містить несуче середовище, яке містить гідрофобний засіб і засіб, який знижує в'язкість; і біоактивну молекулу.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою неводну концентровану суспензійну композицію, що містить несуче середовище, яке містить кунжутну олію і етилолеат; і біоактивну молекулу.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб зниження зусилля ін'єкції до приблизно 45 Ньютонів (Н) або менше для композиції, що містить ≥ 50 мг/мл білка в несучому середовищі, що містить гідрофобний засіб, який містить: додавання щонайменше 28 % об'єму засобу, який знижує в'язкість, в несуче середовище, що містить гідрофобний засіб; або застосування для приготування композиції білкових частинок, що мають розмір приблизно від 2 мкм до 13 мкм, причому зусилля ін'єкції вимірюють за допомогою скляного шприца з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл, що має внутрішній діаметр 0,25 дюйма, з встановленою на ньому голкою розміром $26\frac{1}{2}$ довжиною 0,5 дюйма при швидкості ін'єкції 250 мм/хв.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб одержання неводної концентрованої суспензійної композиції біоактивної молекули, що містить забезпечення біоактивної молекули; забезпечення гідрофобного засобу; забезпечення засобу, який знижує в'язкість; змішування гідрофобного засобу і засобу, який знижує в'язкість, для утворення

несучого середовища; і додавання біоактивної молекули в одержане несуче середовище.

Докладний опис винаходу

Всі публікації, що згадуються в даному описі, включаючи, без обмежень, патенти і патентні заявки, включені шляхом посилань, є частиною цього документа, як якщо вони були викладені безпосередньо в цьому документі.

Потрібно розуміти, що застосовувані в даному документі терміни використовуються тільки з метою опису конкретних варіантів здійснення даного винаходу і не є обмежувальними. Всі технічні і наукові терміни, що використовуються в цьому документі, якщо не вказано інше, мають загальноприйняте значення, зрозуміле будь-якому фахівцеві в даній галузі, до якої належить даний винахід.

У цьому документі описані приклади способів і матеріалів, хоча для аналізу даного винаходу можуть бути використані будь-які способи і матеріали, подібні або еквівалентні тим, які описані в цьому документі. При описі і викладі формули даного винаходу будуть використовуватися наступні терміни.

Використовуваний в даному документі термін "гідрофобний засіб" стосується матеріалу, що має індекс гідрофільно-ліпофільний баланс (HLB) в діапазоні 0-13. Прикладами гідрофобних засобів є рослинні олії, жирні кислоти з 8-24 атомами вуглецю, віск, біорозкладані полімери і амфіфільні матеріали. Прикладами рослинних олій є мигдалева олія, анісова олія, олія з абрикосових кісточок, арахісова олія, арганова олія, олія авокадо, олія огірочника, каяпутова олія, олія канолі, кминна олія, олія акації, рицинова олія, корична олія, цитронелова олія, гвоздична олія, кокосова олія, коріандрова олія, кукурудзяна олія, бавовняна олія, евкаліптова олія, олія первоцвіту вечірнього, фенхельна олія, геранієва олія, олія з виноградних кісточок, олія лісового горіха, конопляна олія, олія жожоба, ялівцева олія, лавандова олія, лимонна олія, олія австралійського горіха, мускатна олія, олія чайного дерева, олія насіння маргози, неролієва олія, олія ніаулі, олія мускатного горіха, оливкова олія, апельсинова олія, пальмова олія, олія пальмових кісточок, соснова олія, макова олія, олія м'яти болотяної, гарбузова олія, рапсова олія, рисова олія, олія шипшини, розмаринова олія, рутова олія, сафлорова олія, кунжутна олія (SO), олія м'яти кучерявої, соєва олія, соняшникова олія, чебрецева олія, горіхова олія і олія зародків пшениці. Прикладами жирних кислот є каприлова кислота, капринова кислота, лауринова кислота, міристинова кислота, пальмітинова кислота, стеаринова кислота, арахідинова кислота, лінолева кислота, міристолеїнова кислота, пальмітолеїнова кислота, сапієнінова кислота, олеїнова кислота, α -ліноленова кислота, арахідонова кислота, ейкозапентаєнова кислота, ерукова кислота, докозагексаєнова кислота, ейкозапентаєнова кислота, докозагексаєнова кислота, докозапентаєнова кислота і гліцериди (моногліцерид; дигліцерид; тригліцерид) з ланцюгами різної довжини. Прикладами біорозкладуваних полімерів є полімолочна кислота (PLA), полігліколева кислота (PGA), співполімер молочної і гліколевої кислот (PLGA), полі- ϵ -капролактон (PCL), поліортоефіри, полігідроксибутират (PHB), полідіоксанон, поліангідриди, політриметиленкарбонат і поліфосфазени. Прикладами амфіфільних матеріалів є поліетоксильована рицинова олія або її похідні (збірно імунні "поліетоксильована рицинова олія"), поліоксіетиленалкіловий ефір, поліоксіетиленовий ефір сорбіту і жирної кислоти, поліоксіетиленстеарат, блок-співполімер поліетиленоксид (PEO)-поліпропіленоксид (PPO)-PEO, блок-співполімер PPO-PEO-PPO, тетрафункціональний блок-співполімер PEO-PPO, такий як $(\text{PEO-PPO})_2(\text{PPO-PEO})_2$, або тетрафункціональний блок-співполімер PPO-PEO, такий як $(\text{PPO-PEO})_2(\text{PEO-PPO})_2$. Приклади гідрофобних засобів і їх характеристики наведені в таблиці 1. В'язкості вимірюють при температурі 25 °C, якщо інше не вказане в дужках.

Використовуваний в даному документі термін "в'язкість" являє собою ступінь опірності рідини течії. В'язкість може являти собою "кінематичну в'язкість" або "абсолютну в'язкість". "Кінематична в'язкість" являє собою ступінь резистивної течії рідини під дією сили тяжіння. Якщо дві рідини однакового об'єму помістити в однакові капілярні віскозиметри і дозволити їм текти під дією сили тяжіння, більш в'язкій рідині буде необхідно більше часу для протікання через капіляр в порівнянні з менш в'язкою рідиною. Розмірністю кінематичної в'язкості є L^2/T , де L являє собою довжину, а T являє собою час. Кінематичну в'язкість звичайно виражають в сантистоксах (сСт). Одиницею вимірювання кінематичної в'язкості в міжнародній системі одиниць (СИ) є $\text{мм}^2/\text{сек}$, що становить $1\text{E-6 м}^2/\text{сек}$ (1 сСт). "Абсолютна в'язкість", яка іноді називається "динамічною" або "простою в'язкістю", являє собою похідне кінематичної в'язкості і густини рідини. Абсолютна в'язкість виражається в одиницях сантипуаз (сП). Одиницею вимірювання абсолютної в'язкості в системі СИ є міліпаскаль-секунда (мПа-сек), де $1\text{ сп} = 1\text{ мПа-сек}$. В'язкість можна вимірювати за допомогою, наприклад, віскозиметра при заданій швидкості зсуву. В'язкість також можна оцінювати з використанням позитивної кореляції між в'язкістю і

зусиллям ін'єкції, як показано на фіг. 4.

Таблиця 1

| Родова назва | В'язкість (сП) | | Спосіб введення |
|--|----------------|-----------------------|--|
| | Літературна | Виміряна | |
| Каприлокапроілполіоксил-8-гліцериди | 89 | | перорально |
| Рицинова олія, етоксильована | 722 | | внутрішньовенно |
| Кукурудзяна олія | | 44,9 | внутрішньом'язово |
| Бавовняна олія | | 47,7 | внутрішньом'язово |
| Моноолеат гліцерилу | 30-40 | | топічно, перорально, черезшкірно |
| Тригліцериди з середньою довжиною ланцюга | 30 | 27,12 (20 °C), 22,64 | внутрішньовенно, перорально, топічно |
| Поліоксietилентригліцериди олеїнової кислоти | 80 | | |
| Пропіленгліколю дикаприлокапрат | 12 | 11,16 (20°C), 9,66 | топічно |
| Пропіленгліколю монокаприлат | 20 | 14,49 (20 °C), 12,05 | |
| Пропіленгліколю монолаурат | 25 | 26,80 (20°C), 21,91 | черезшкірно |
| Кунжутна олія | | 51,3 | внутрішньом'язово, підшкірно, перорально |
| Симетикон | 400 | 482,63 (20°C), 448,37 | внутрішньом'язово, внутрішньовенно |
| Рідка рослинна олія | 25,4 | 22,7 | перорально, топічно |

Використовуваний в даному документі термін "швидкість зсуву" означає швидкість деформування матеріалу. Для класичних ньютонівських рідин в'язкість не залежить від швидкості зсуву. Для неньютонівських рідин в'язкість або падає, або підвищується зі збільшенням швидкості зсуву, тобто рідини при зсуві або "розріджуються", або "загущуються", відповідно.

Використовуваний в даному документі термін "зусилля ін'єкції" означає силу, що вимірюється в Ньютонах (Н), необхідну для проштовхування несучого середовища або композиції через скляний шприц з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл, що має внутрішній діаметр 0,25 дюйма, з встановленою на ньому голкою розміру 26½ довжиною 0,5 дюйма при швидкості ін'єкції 250 мм/хв з використанням випробувального інструмента Zwick/Roell (модель 2005) (Zwick Roell, м. Кенесо, штат Джорджія, США). Прикладом такого шприца є шприц компанії BD (Becton, Dickinson and Company, штат Нью-Джерсі, США) BD Нурак SCF™, попередньо наповнюваний скляний шприц з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл зі встановленою на ньому голкою розміру 26½ довжиною 1,3 см (0,5 дюйми) (код продукту PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589).

Використовуваний в даному документі термін "характеристики ін'єкційного введення" стосується характеристик ін'єкційного введення неводної концентрованої суспензійної композиції через шприц з голкою заданого розміру при ін'єкції. Характеристики ін'єкційного введення включають в себе такі фактори, як тиск або зусилля, необхідні для ін'єкції, однорідність течії, якість аспірації композиції і відсутність грудкування. Характеристики ін'єкційного введення композицій даного винаходу оцінюють шляхом порівняння зусилля ін'єкції композиції, яка містить засіб, який знижує в'язкість, і тієї ж композиції, яка не містить засіб, який знижує в'язкість. Зниження зусилля ін'єкції для композиції, що містить засіб, який знижує в'язкість, відображає поліпшення характеристик ін'єкційного введення композиції. Композиція, що містить засіб, який знижує в'язкість, має поліпшені характеристики ін'єкційного введення при зниженні зусилля ін'єкції щонайменше на 10 %, наприклад на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % або 99 % в порівнянні з тією ж композицією, яка не містить засіб, який знижує в'язкість.

Використовуваний в даному документі термін "засіб, який знижує в'язкість" стосується засобу, який, при його присутності в складі несучого середовища або композиції, знижує в'язкість або зусилля ін'єкції несучого середовища або композиції в порівнянні з в'язкістю або

зусиллям ін'єкції несучого середовища або композиції, що не містить засіб, який знижує в'язкість. Кількість засобу, який знижує в'язкість, яка присутня в несучих середовищах або композиціях зі зниженою в'язкістю даного винаходу, може знаходитися в діапазоні приблизно від 0,2 % до 99,9 % об'єму засобу, який знижує в'язкість, в гідрофобному засобі і становити, наприклад, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 %. У деяких випадках несуче середовище може на 100 % складатися із засобу, який знижує в'язкість. Засіб, який знижує в'язкість, може знизити в'язкість або зусилля ін'єкції несучого середовища або композиції щонайменше на 10 %, наприклад на 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % або 90 %. Прикладами засобів, які знижують в'язкість, є діетилсебацінат, моноетиловий ефір діетиленгліколю, етиловий спирт, етилолеат (ЕО), ізопропіловий спирт (ІРА), ізопропілмірістат, лінолева кислота, пропіонова кислота, триетилцитрат, пропіленгліколь, етанол, пропанол, ізопропанол, поліетиленгліколь, перфторофіри, фторовані вуглеводні (галотан, метоксифлуран, енфлуран, ізофлуран, севофлуран і десфлуран і т. п.), фторовані кетони, перфтордекалін, перфторакрилат, перфторметакрилат, бензиловий спирт, лауриловий спирт, перфтордекалін, N-метил-2-піролідон, глікофуrol, поліетиленгліколь (ПЕГ), алкілкетон, ефіри нижчих алкілів і лимонної кислоти, бензилбензоат, метилбензоат, етилбензоат, n-пропілбензоат, ізопропілбензоат, бутилбензоат, ізобутилбензоат, втор-бутилбензоат, тре-бутилбензоат та ізоамілбензоат. Характеристики прикладів засобів, що знижують в'язкість, наведені в таблиці 2.

Коли додавання засобу, який знижує в'язкість, приводить до зниження в'язкості або зусилля ін'єкції несучого середовища в порівнянні з відповідним несучим середовищем, яке не містить засіб, який знижує в'язкість, несуче середовище, що містить засіб, який знижує в'язкість, являє собою "несуче середовище зі зниженою в'язкістю". Композиція, що містить несуче середовище зі зниженою в'язкістю, являє собою "композицію зі зниженою в'язкістю". Незалежно від способу, що застосовується для визначення і вимірювання в'язкості або зусилля ін'єкції, процентне зниження в'язкості або зусилля ін'єкції для несучого середовища або композиції зі зниженою в'язкістю в порівнянні з тим же несучим середовищем або композицією, що не містить засіб, який знижує в'язкість, при заданій швидкості зсуву залишається приблизно однаковим.

Термін "хімічна стабільність (стійкість)" означає формування прийнятної відносної кількості продуктів деструкції, що утворюються хімічними шляхами, такими як окиснення, деамідування або гідроліз. Композиція вважається хімічно стабільною, якщо кількість продуктів розкладання не перевищує 5 % після зберігання протягом 18 місяців при температурі 4 °С.

Термін "фізична стабільність (стійкість)" означає формування прийнятної відносної кількості агрегатів (наприклад, димерів, тримерів або інших мультимерних агрегатів) біоактивного засобу. Композиція вважається фізично стабільною, якщо кількість агрегатів не перевищує приблизно 5 % після зберігання протягом 18 місяців при температурі 4 °С.

Використовуваний в даному документі термін "стабільна композиція" або "стабільний" означає, що в композиції зберігається щонайменше приблизно 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % фізично стабільних біоактивних молекул після зберігання протягом 18 місяців при температурі +4 °С або еквівалентних умовах при підвищеній температурі, таких як зберігання протягом 1 місяця при температурі +40 °С. Прикладом стабільної композиції є композиція 30 % mAb проти ФНО-α ЕО/СО/50/50, в якій після зберігання протягом 1 місяця при температурі +40 °С в мономерній формі зберігається щонайменше 98 % антитіл.

Таблиця 2

| Родова назва | В'язкість (сП) | | Спосіб введення |
|-----------------------------------|----------------|----------|---|
| | Літературна | Виміряна | |
| Діетилсебацінат | 3,9 | 5,59 | топічно |
| Діетиленгліколю моноетиловий ефір | 20 | 4,89 | внутрішньовенно, топічно, черезшкірно |
| Етиловий спирт (EtOH) | 1,2 | 1,48 | внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно |
| Етилолеат (EO) | 5,9 | 5,96 | черезшкірно, внутрішньом'язово |
| Ізопропіловий спирт (IPA) | 2,43 | 2,35 | внутрішньовенно, перорально, черезшкірно |
| Ізопропілміристант | 7 | 5,1 | топічно |
| Лінолева кислота | | 18,67 | |
| Пропіонова кислота | 1 | 1,65 | |
| Триетилцитрат | | 25,65 | перорально |

Термін "біоактивна молекула" включає в себе білки, антитіла, пептиди, нуклеотиди і т. п. В цей термін включаються синтетично одержані, виділені з природних матеріалів або рекомбінантно одержані сполуки. Біоактивні молекули можуть являти собою аналоги, похідні, агоністи, антагоністи або фармацевтично прийнятні солі біоактивних молекул.

Термін "білок" означає молекулу, що містить щонайменше два амінокислотних залишки, зв'язаних пептидним зв'язком з утворенням поліпептиду. Малі білки, що містять менше 50 амінокислотних залишків, можуть називатися "пептидами". Білки можуть також називатися "поліпептидами".

Термін "антитіло" включає в себе суцільні антитіла, а також будь-які їх фрагменти. Фрагменти антитіла містять щонайменше частину молекули імуноглобуліну, таку як визначаюча комплементарність ділянка (CDR), варіабельна ділянка (V), константна ділянка (C) або каркасна ділянка (FR) важкого або легкого ланцюга антитіла. Імуноглобуліни можна розділити на п'ять великих класів, а саме: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, залежно від амінокислотної послідовності C-домена важкого ланцюга. IgA і IgG додатково поділяються на ізотипи IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ і IgG₄. Виходячи з амінокислотної послідовності константних доменів, легкий ланцюг антитіла будь-якого виду хребетних може бути віднесений до одного з двох типів, що чітко розрізняються, а саме: капа (κ) і лямбда (λ).

Антитіло може являти собою Fab, F(ab')₂, scFv, dsFv або діателу. Антитіло може являти собою моноклональне антитіло (mAb), химерне, гуманізоване або людське антитіло, димерне, тетрамерне або мультимерне антитіло. Структури перерахованих вище фрагментів антитіл і способи приготування і використання антитіл і їх фрагментів добре відомі фахівцям (під ред. Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., м. Нью-Йорк, 1987-2001 pp.; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2-е видання, Cold Spring Harbor, штат Нью-Йорк, 1989 p.; Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, штат Нью-Йорк, 1989 p.; під ред. Colligan, et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., м. Нью-Йорк, 1994-2001 pp.; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, м. Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, 1997-2001 pp.; Kohler et al., Nature, 256:495-7, 1975 p.; Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-33, 1989 p.; патент США № 4816567).

Використовуваний в даному документі термін "концентрований" означає кінцеву концентрацію біоактивної молекули в композиції, яка дорівнює або більше 50 мг/мл. Концентрація біоактивної молекули може знаходитися в діапазоні 50-1000 мг/мл, в діапазоні 50-500 мг/мл або в діапазоні 50-250 мг/мл.

Використовуваний в даному документі термін "неводний" означає, що несуте середовище має малу розчинність у воді, менше ніж 0,1 мг/г, при фізіологічних рН (приблизно 7,4) і температурі приблизно 25 °C.

Використовуваний в даному документі термін "суспензійна композиція" означає, що біоактивна молекула нерозчинна в несучому середовищі.

Використовуваний в даному документі термін "розмір частинки" означає середній діаметр

(D50) частинок біоактивних молекул в композиції, що визначається з використанням добре відомих інструментів для вимірювання розміру, наприклад лазерного дифракційного аналізатора розміру частинок.

У даному винаході описані неводні концентровані суспензійні композиції зниженої в'язкості, які можна використовувати для введення пацієнту біоактивних молекул, таких як антитіла, парентеральним способом. Висока в'язкість, характерна для концентрованих білкових композицій, може ускладнити введення пацієнту необхідної дози шляхом шприцевої ін'єкції. Композиції даного винаходу мають поліпшені характеристики ін'єкційного введення за результатами вимірювання зусилля ін'єкції композицій при збереженні високої концентрації біоактивної молекули, яка забезпечить одержання необхідної дози для досягнення прийнятної терапевтичної ефективності. Композиції даного винаходу мають зусилля ін'єкції, що дорівнює або менше 45 Ньютонів (Н), максимального зусилля, яке велика частина медичних працівників і пацієнтів без пошкоджень рук можуть розвинути при використанні шприца для проведення ручної ін'єкції. Прийнятний рівень зусилля ін'єкції залежить від конкретного використовуваного лікарського засобу і пристроїв доставки, що використовуються в продуктах. Деякі пристрої дозволяють створювати більші зусилля ін'єкції в порівнянні з іншими.

Концентрація біоактивної молекули в композиціях приводиться у % ваг. (% в/в), а кількість засобу, який знижує в'язкість, в несучому середовищі приводиться в об'ємних % (% об/об), якщо інше не обумовлено особливо. Композиції несучого середовища наведені у відносних об'ємних % (% об/об) засобу, який знижує в'язкість, і гідрофобного засобу. Наприклад, EO/SO/50/50 являє собою несуче середовище, що містить 50 % об'єму етилолеату (EO) і 50 % об'єму кунжутної олії (SO).

Один варіант здійснення даного винаходу являє собою неводну концентровану суспензійну композицію, що містить:

- a. несуче середовище, що містить гідрофобний засіб і засіб, який знижує в'язкість; і
- b. біоактивну молекулу.

Несуче середовище можна одержати шляхом змішування гідрофобного засобу і засобу, який знижує в'язкість, в рідкому вигляді і прогрівання суміші до утворення однофазного матеріалу. Для підтвердження того, що всі включені до складу несучого середовища компоненти перемісилися з утворенням однофазного матеріалу, можна використовувати стандартні способи, такі як диференціальна скануюча калориметрія. Приклади гідрофобних засобів і засобів, що знижують в'язкість, описані вище. Приклади несучих середовищ на основі кунжутної олії наведені в таблиці 4. Кунжутну олію можна замінити на інші приклади гідрофобних засобів за умови, що засіб, який знижує в'язкість, змішується з вибраним гідрофобним засобом.

Для одержання частинок біоактивної молекули, що вводиться до складу композицій даного винаходу, можна використовувати будь-який придатний спосіб формування частинок. Приклади добре відомих способів включають в себе розпилювальне сушіння, ліофільне сушіння, ліофілізацію, десикацію, гранулювання, розтирання, подрібнення, осадження, технології з використанням надкритичних рідин або процеси гомогенізації. Одержані вказаними способами частинки можна додатково подрібнити в гомогенізаторі Уорінга і пропустити через послідовність сит із заданими розмірами комірки. Розміри одержаних частинок біоактивних молекул можуть становити, наприклад, від 0,2 до 250 мкм, від 0,2 до 100 мкм, від 0,2 до 50 мкм, від 0,2 до 20 мкм або від 2 до 13 мкм. Розміри частинок можна виражати в формі середнього діаметра (D50) частинок біоактивної молекули в композиції, що визначається з використанням добре відомих інструментів для вимірювання розміру, наприклад лазерного дифракційного аналізатора розміру частинок (Malvern Mastersizer 2000, Malvern), або в формі діаметра комірки сита, через яке частинки не проходять.

Біоактивну молекулу можна використовувати в чистому вигляді або в суміші з ексципієнтами, які не знижують терапевтичної ефективності біоактивної молекули. Наприклад, може виявитися корисним використовувати ексципієнти для придушення агрегації і окиснення біоактивної молекули в неводних композиціях, для поліпшення переходу біоактивної молекули з неводного несучого середовища в середовище організму або для поліпшення формованості біоактивної молекули в частинки. Такі ексципієнти являють собою, наприклад, вуглеводи, неіонні ПАР, буферні розчини, солі, антиоксиданти і/або амінокислоти, консерванти і т. п.

Біоактивну молекулу можна ввести, наприклад, в суміші з вуглеводом, неіонним ПАР і буферним розчином як ексципієнти. Прикладами вуглеводів є сахароза, трегалоза, маніт, декстран і сорбіт. Прикладами неіонних ПАР є полісорбат 20 (PS-20), полісорбат 80 (PS-80), Triton X-100, Brij-35, Brij-30 і Pluronic F127. Біоактивну молекулу можна ввести в композицію в буферному розчині з необхідним рН до формування білкових частинок, щоб запобігти

окисненню, деамідуванню, гідролізу, денатурації або агрегації і зберегти біологічну активність біоактивної молекули в процесі приготування композиції і її подальшого зберігання. Прикладами буферних розчинів є ацетатний, цитратний, форміатний, гістидиновий, сукцинатний, фосфатний, карбонатний, малеатний, NEPPSO, HEPES, боратний, гліциновий, аспартатний, проліновий і трис-буферні розчини.

Додаткові ексципієнти в складі композиції можуть включати в себе амінокислоту. Прикладами амінокислот є гістидин, ізолейцин, метіонін, гліцин, аргінін, лізин, L-лейцин, трилейцин, аланін, глутамінова кислота, L-треонін і 2-феніламін.

Додаткові ексципієнти можуть включати в себе солі. Прикладами солей є хлорид натрію, хлорид кальцію і хлорид магнію.

Додаткові ексципієнти можуть включати в себе полімери. Прикладами полімерів є полівінілпіролідон (ПВП), декстран і поліетиленгліколі.

Кількості ексципієнтів в композиції можна визначити експериментально на основі активності ексципієнтів і необхідних характеристик композиції, таких як стабільність, мінімальне окиснення і формованість частинок в процесі розпилювального сушіння.

Біоактивну молекулу і ексципієнти можна розчинити з одержанням розчину, який потім, наприклад, ліофілізують, сушать розпиленням або сублімаційним розпиленням для одержання частинок біоактивної молекули.

Прикладом біоактивної молекули є антитіло або фрагмент антитіла. Прикладом антитіла є антитіло до фактору некрозу пухлини- α (ФНО- α), таке як TNV14, TNV15, TNV148, TNV148B і TNV196, показані на фіг. 12, які містять послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, показані в послідовностях SEQ ID: 1 (TNV14), 2 (TNV15), 3 (TNV148), 4 (TNV148B) і 5 (TNV196), і послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, показані в послідовностях SEQ ID NO: 6 (TNV14 і TNV15) і 7 (TNV148, TNV148B і TNV196). TNV148B також називають CNTO148. Іншим прикладом антитіла проти ФНО- α є антитіло до ФНО- α людини (адалімумаб-білок) серії HUMIRA®, описаний в патенті США № 6258652; реєстраційний номер CAS 331731-18-1. Варіабельні ділянки антитіла проти ФНО- α можна з'єднати з будь-якою константною ділянкою, наприклад константною ділянкою типу IgG1 і к відповідно. Приклад константної ділянки IgG1 показаний в SEQ ID NO: 8, а приклад константної ділянки к показаний в SEQ ID NO: 9.

Приклади композицій на основі біоактивних молекул, наприклад антитіл до фактору некрозу пухлини- α (ФНО- α), можуть включати в себе один або більше з наступних ексципієнтів: вуглевод з приблизним співвідношенням вуглевод:білок 0-3, 0,5-3, 1-3 або 1-2; амінокислоту з приблизним співвідношенням амінокислота:білок 0-2 або 0,3-1,8; амінокислоту з приблизним співвідношенням, в якому відношення взятих разом по вазі вуглеводу і білка до білка становить приблизно 0-3, 0,5-3, 1-3 або 1-2; приблизно 0-40 мМ, 5-40 мМ, 5-20 мМ або 5-10 мМ гістидинового буферного розчину; приблизно 0-20 мМ, 5-20 мМ або 5-10 мМ цитратного буферного розчину; де відношення ексципієнт:білок наведені як відношення в/в, і приблизно 0-0,1 % (% в/об), 0,01-0,1 % (% в/об) або 0,01-0,05 % PS-80 (% в/об). рН можна довести до приблизно 5,5. Прикладами композицій на основі антитіла проти ФНО- α є композиції, одержані розпилювальним сушінням CNTO148 і, що містять 32,5 мг/мл CNTO148, 10 мМ гістидину, 55 мг/мл сахарози, 10 мг/мл ізолейцину, 0,01 % PS-80, рН 5,5; 32,5 мг/мл CNTO148, 10 мМ гістидину, 65 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, рН 5,5; 32,5 мг/мл CNTO148, 5 мМ гістидину/5 мМ цитрату, 65 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, рН 5,5; 32,5 мг/мл CNTO148, 10 мМ гістидину, 5 мг/мл сахарози, 22,5 мг/мл маніту, 0,01 % PS-80, рН 5,5; або 32,5 мг/мл CNTO148, 10 мМ гістидину, 55 мг/мл трегалози, 10 мг/мл ізолейцину, 0,01 % PS-80, рН 5,5; або 65 мг/мл CNTO148, 10 мМ гістидину, 55 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, рН 5,5. Концентрації PS-80 в цьому документі вказані у % в/об. Методи розпилювального сушіння добре відомі фахівцям в даній галузі. Приклад такого способу описаний нижче в прикладі 2.

Для одержання суспензійної композиції біоактивної молекули сухі частинки біоактивної молекули в твердому стані (наприклад, у вигляді порошку, кристалічного або аморфного стану) з додаванням або без додавання ексципієнтів диспергують шляхом перемішування в несучому середовищі. Кількість ввідних до складу композиції частинок біоактивної молекули можна варіювати залежно від, наприклад, активності біоактивної молекули і передбачуваного способу введення композиції. Наприклад, біоактивна молекула може становити приблизно від 0,1 % до 70 % (% в/в) композиції, при цьому несуче середовище становить приблизно від 30 % до 99,9 % (% в/в). Біоактивна молекула може бути присутня в несучому середовищі у вигляді суспензії в концентрації приблизно від 50 мг/мл до 1000 мг/мл, від 50 мг/мл до 500 мг/мл або від 50 мг/мл до 250 мг/мл. Приклади композицій складаються з 40 % (% в/в) частинок mAb проти ФНО- α , одержаних розпилювальним сушінням розчину 65 мг/мл mAb проти ФНО- α , 55 мг/мл сахарози, 10 мМ L-гістидину, 0,01 % PS-80, рН 5,5, і 60 % (% в/в) несучого середовища, що складається з

кунжутної олії і етилолеату (об'ємне співвідношення 50:50). Оскільки біоактивна молекула присутня в такій високій концентрації, неводну суспензійну композицію можна використовувати для введення пацієнту біоактивної молекули, що має низьку активність. Оскільки біоактивна молекула зберігається в своїй твердій формі, можна очікувати великих термінів зберігання композиції.

Хоча описані в прикладах композиції містять композиції на основі CNTO148, замість CNTO148 можна використовувати інші антитіла й інші антитіла проти ФНО- α для розробки композицій з характеристиками, аналогічними характеристикам описаної композиції на основі CNTO148, наприклад, неводних концентрованих суспензійних композицій зі зниженою в'язкістю, з високою стабільністю і хорошими характеристиками ін'єкційного введення при збереженні біоактивності на рівні водних композицій.

В'язкість несучих середовищ і композицій даного винаходу можна вимірювати з використанням добре відомих інструментів для вимірювання в'язкості, таких як реометр. В'язкість несучого середовища або композиції можна вимірювати як функцію швидкості зсуву в діапазоні, наприклад, 200-500 сек⁻¹ при температурі 25 °C з використанням реометра AR2000 (TA Instruments) і розраховувати середню в'язкість у вказаному діапазоні швидкостей зсуву або залежно від заданої швидкості зсуву, наприклад 250 сек⁻¹. В'язкість несучих середовищ і композицій даного винаходу також можна оцінювати шляхом вимірювання для них зусилля ін'єкції, яке позитивно корелює з в'язкістю (Фіг. 4). Зусилля ін'єкції можна виміряти шляхом, наприклад, вміщення підготовлених композицій в скляний шприц з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл, що має внутрішній діаметр 0,25 дюйма, з встановленою на ньому голкою розміру 26½ довжиною 0,5 дюйма, і встановлення швидкості ін'єкції, такою, що дорівнює, наприклад, 250 мм/хв, і записи зусилля переміщення поршня з використанням випробувального інструмента Zwick/Roell (модель 2005) (Zwick Roell, м. Кенесо, штат Джорджія, США). Прикладом такого шприца є шприц компанії BD (Becton, Dickinson and Company, штат Нью-Джерсі, США) BD Нупак SCF™, попередньо наповнюваний скляний шприц з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл з встановленою на ньому голкою розміру 26½ довжиною 1,3 см (0,5 дюйма) (код продукту PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589). Для оцінки впливу засобів, що знижують в'язкість, на в'язкість і характеристики ін'єкційного введення композицій даного винаходу вимірюють відносне (%) зниження в'язкості або зусилля ін'єкції. Наприклад, білкові неводні концентровані композиції даного винаходу можуть мати зниження в'язкості на 81 % або зниження зусилля ін'єкції на 76 % в порівнянні з композиціями без засобу, який знижує в'язкість.

Додатково знизити в'язкість неводних концентрованих суспензійних композицій даного винаходу і тим самим поліпшити характеристики ін'єкційного введення композицій можна зміною швидкості зсуву. Ньютонівські або неньютонівські характеристики композицій даного винаходу можна проаналізувати по залежності в'язкості від швидкості зсуву. Неньютонівські характеристики композицій можуть залежати від концентрації білка і кількості засобу, який знижує в'язкість, в композиції. Підвищення концентрації білка в композиціях даного винаходу може змістити характеристики композиції у бік неньютонівського розрідження при зсуві, і тим самим підвищення швидкості зсуву в процесі виробництва може знизити в'язкість і поліпшити характеристики обробки таких композицій. Збільшення кількості засобу, який знижує в'язкість, в композиції може змістити характеристики композиції у бік ньютонівської поведінки, і в цьому випадку зміна швидкості зсуву практично не позначається на в'язкості. Одержання композицій даного винаходу включає в себе оцінку впливу швидкості зсуву на в'язкість і корегування швидкості зсуву в діапазоні, наприклад, 10-1000 1/сек або 50-500 1/сек для одержання композицій з відповідними величинами в'язкості.

Композиції на основі біоактивних молекул даного винаходу мають підвищену стабільність в порівнянні з водними композиціями і зберігають щонайменше 95 % біоактивних молекул в стабільній формі після зберігання протягом одного місяця при температурі +40 °C. Стабільність композицій можна вимірювати з використанням добре відомих способів. Наприклад, ступінь агрегації білків можна вимірювати шляхом візуального спостереження каламутності, шляхом вимірювання оптичного поглинання на вибраній довжині хвилі, з використанням ексклюзивної хроматографії (коли агрегати білка і білок в нативному активному стані елюються в різних фракціях), ВЕРХ або інших хроматографічних способів. Можна використовувати й інші способи вимірювання конформаційних змін, включаючи застосування диференціальної скануючої калориметрії (DSC), наприклад, для визначення температури денатурації або вимірювання кругового дихроїзму (CD), при якому визначається молярна еліптичність білка.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою неводну концентровану суспензійну композицію, що містить несуче середовище, яке містить кунжутну олію і етилолеат; і біоактивну

молекулу.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб зниження зусилля ін'єкції до приблизно 45 Ньютонів (Н) або менше для композиції, яка містить ≥ 50 мг/мл білка в несучому середовищі, що містить гідрофобний засіб, що містить: додавання щонайменше 28 % об'єму засобу, який знижує в'язкість, в несуче середовище, що містить гідрофобний засіб; або застосування для приготування композиції білкових частинок, що мають розмір приблизно від 2 мкм до 13 мкм, причому зусилля ін'єкції вимірюють за допомогою скляного шприца з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл, що має внутрішній діаметр 0,25 дюйма, з встановленою на ньому голкою розміром $26\frac{1}{2}$ довжиною 0,5 дюйма при швидкості ін'єкції 250 мм/хв.

Для збереження зусилля ін'єкції неводної концентрованої суспензійної композиції даного винаходу на рівні 45 Ньютонів (Н) або нижче можна змінювати декілька параметрів. Такі параметри включають в себе, наприклад, концентрацію білка, розмір частинок, кількість засобу, який знижує в'язкість, в композиції і швидкість ін'єкції, що використовується для вибраного шприца з вказаним розміром голки. Кількість засобу, який знижує в'язкість, в композиціях, що мають зусилля ін'єкції на рівні 45 Н або нижче, може становити, наприклад, 0,2 %-99,9 %, кількість білка може становити 1-40 % (% в/в), і розмір частинок може становити приблизно від 2 мкм до 13 мкм. Прикладами неводних композицій, що містять гідрофобний засіб, засіб, який знижує в'язкість, і біоактивну молекулу і що мають зусилля ін'єкції менше 45 Н, є композиції, що мають концентрацію білка щонайменше 20 % (% в/в) при розмірі частинок приблизно від 2 мкм до 13 мкм і щонайменше 28 % ЕО в несучому середовищі; 20 % (% в/в) суспензії 2 мкм частинок БСА в ЕО/СО/28/72, ЕО/СО/50/50 або в 100 % ЕО; 20 % (% в/в) суспензій mAb проти ФНО- α в ЕО/СО/50/50, ЕО/СО/73/30, ЕО/СО/85/15 або в 100 % ЕО; 30 % і 40 % (% в/в) суспензій mAb проти ФНО- α в ЕО/СО/50/50; 40 % суспензій 13 мкм частинок БСА в ЕО/СО/50/50; 50 % (% в/в) суспензій 2 мкм частинок БСА в 100 % ЕО при швидкості ін'єкції 50 мм/хв; і 50 % (% в/в) суспензій 13 мкм частинок БСА при швидкості ін'єкції 50-250 мм/хв.

Інший варіант здійснення даного винаходу являє собою спосіб одержання неводної концентрованої суспензійної композиції біоактивної молекули, що містить забезпечення біоактивної молекули; забезпечення гідрофобного засобу; забезпечення засобу, який знижує в'язкість; змішування гідрофобного засобу і засобу, який знижує в'язкість, для утворення несучого середовища; і додавання біоактивної молекули в несуче середовище, одержане на стадії d, в концентрації 50 мг/мл або більше.

Композиції даного винаходу можна попередньо вмішувати в шприци або будь-який інший відповідний контейнер малого об'єму з використанням добре відомих способів, тому вони є готовими без необхідності змішування, відновлення або будь-яких інших додаткових підготовчих процедур. Композиції даного винаходу в попередньо заповнених шприцах можна вводити вручну або, в альтернативному варіанті здійснення, можна вводити з використанням автоматичного ін'єктора, такого як автоматичний шприц-ручка, автоін'єктор, різні автоматичні ін'єкційні насоси, включаючи насоси-пластири і безголкові пристрої. Композиції даного винаходу можна вводити пацієнту парентеральними способами, такими як підшкірна (SC) або внутрішньом'язова (IM) ін'єкція. Композиції можна вводити через голки довжиною приблизно від половини дюйма до 5,1 см (два дюйми), розміром 20-31 з внутрішнім діаметром в діапазоні від 133 до 604 мікрон. Готові до ін'єкції неводні концентровані суспензійні композиції даного винаходу можуть мати сприятливу місцеву переносимість (або біосумісність), низьке зусилля ін'єкції і гнучкість складу композиції. Високу концентрацію біоактивної молекули в готовій до ін'єкції неводній суспензійній композиції можна одержати незалежно від молекулярної структури і молекулярної ваги біоактивної молекули.

Даний винахід далі буде розглянутий з посиланням на конкретні необмежувальні приклади.

Приклад 1

Скринінг засобів, які знижують в'язкість, для неводних несучих середовищ

Засоби, які знижують в'язкість, додавали в кунжутну олію в концентрації від 0,2 % до 50 % об'єму. Всі засоби, які знижують в'язкість, належали до категорії загально визнаних безпечних (GRAS) матеріалів. Суміш вмішували в закритий скляний флакон об'ємом 20 мл, перемішували на вортексі протягом 30 секунд і візуально оглядали на наявність будь-яких ознак незмішуваності. Деякі засоби, що знижують в'язкість, виявилися незмішуваними з кунжутною олією і далі не аналізувалися. У таблиці 3 наведена змішуваність прикладів засобів, що знижують в'язкість, з кунжутною олією. Д і Н вказують, що перевірений засіб, який знижує в'язкість, виявився змішуваним або незмішуваним, відповідно, з кунжутною олією при перевірених концентраціях.

Таблиця 3

| Засіб, який знижує в'язкість | Засіб, який знижує в'язкість, % (об/об) | | | | | | | | |
|------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|-------------|
| | 0,2 | 0,7 | 1,7 | 3,1 | 5,4 | 9,7 | 17,2 | 30,0 | 50,0 |
| Діацетил | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Н | Н |
| Етанол | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Н | Н | Н |
| Етилолеат | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д |
| Ізопропанол | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Немає даних |
| Молочна кислота | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н |
| Лінолева кислота | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Немає даних |
| Пропіонова кислота | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Немає даних |
| Пропіленгліколь | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н | Н |
| Триетилцитрат | Д | Д | Д | Д | Д | Д | Н | Н | Н |

Деякі засоби, що знижують в'язкість, такі як етилолеат, ізопропанол, лінолева кислота і пропіонова кислота, змішувалися з кунжутною олією у всьому діапазоні перевірених концентрацій, тоді як пропіленгліколь виявився абсолютно незмішуваним. Деякі засоби змішувалися з кунжутною олією тільки при певних співвідношеннях засобу, який знижує в'язкість, і кунжутної олії.

Для вимірювання в'язкості несучого середовища після утворення однорідного розчину 290 мкл несучого середовища, що перевіряється, піпетували в реометр AR2000 (TA Instruments)

Таблиця 4

| Засіб, який знижує в'язкість | Засіб, який знижує в'язкість, (% об/об) | Кунжутна олія (% об/об) | Середня в'язкість (сПз) | CO* | Підвищення в'язкості (сПз)** |
|------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|------|------------------------------|
| Етилолеат | 0 | 100 | 51,25 | 0,32 | |
| | 0,2 | 99,8 | 50,14 | 0,06 | -1,11 |
| | 0,7 | 99,3 | 50,09 | 0,22 | -1,16 |
| | 1,5 | 98,5 | 48,15 | 0,1 | -3,1 |
| | 3 | 97 | 45,85 | 0,81 | -5,4 |
| | 5,5 | 94,5 | 43,01 | 0,05 | -8,24 |
| | 9,5 | 90,5 | 38,8 | 0,36 | -12,45 |
| | 17 | 83 | 32,65 | 0,15 | -18,6 |
| | 28 | 72 | 25,64 | 0,14 | -25,61 |
| | 50 | 50 | 16,7 | 0,09 | -34,55 |
| | 75 | 25 | | | |
| | 85 | 15 | | | |
| Лінолева кислота | 100 | 0 | 5,96 | 0,19 | -45,29 |
| | 3 | 97 | 50,21 | 1,26 | -1,04 |
| | 9,5 | 90,5 | 46,98 | 0,38 | -4,27 |
| | 17 | 83 | 42,3 | 0,74 | -8,95 |
| | 28 | 72 | 38 | 0,33 | -13,25 |
| Пропіонова кислота | 3 | 97 | 42,48 | 0,91 | -8,77 |
| | 9,5 | 90,5 | 30,99 | 0,49 | -20,26 |
| | 17 | 83 | 21,06 | 0,14 | -30,19 |
| | 28 | 72 | 12,83 | 0,22 | -38,42 |
| Діетилсебацінат | 3 | 97 | 46,33 | 0,8 | -4,92 |
| | 9,5 | 90,5 | 38,82 | 0,2 | -12,43 |
| | 17 | 83 | 30,85 | 0,42 | -20,4 |
| | 28 | 72 | 23,59 | 0,23 | -27,66 |
| Ізопропілміристант | 3 | 97 | 45,92 | 1,3 | -5,33 |
| | 9,5 | 90,5 | 38,55 | 0,53 | -12,7 |
| | 17 | 83 | 31,88 | 0,2 | -19,37 |

Таблиця 4

| Засіб, який знижує в'язкість | Засіб, який знижує в'язкість, (% об/об) | Кунжутна олія (% об/об) | Середня в'язкість (сПз) | CO* | Підвищення в'язкості (сПз)** |
|------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|------|------------------------------|
| | 28 | 72 | 24,09 | 0,18 | -27,16 |
| Ізопропіловий спирт (IPA) | 3 | 97 | 43,95 | 0,73 | -7,3 |
| | 9,5 | 90,5 | 33,14 | 0,13 | -18,11 |
| | 17 | 83 | 25 | 0,4 | -26,25 |
| | 28 | 72 | 13,81 | 0,05 | -37,44 |
| Етанол (EtOH) | 3 | 97 | 41,96 | 0,42 | -9,29 |
| | 9,5 | 90,5 | 31,25 | 1,58 | -20 |
| Триетилцитрат | 3 | 97 | 49,76 | 0,09 | -1,49 |
| | 9,5 | 90,5 | 45,36 | 0,74 | -5,89 |

*стандартне відхилення

**порівняння з несучим середовищем SO

зі встановленим акриловим конусом розміром 40 мм, кутом 1°. Записували напруження зсуву залежно від швидкості зсуву аж до швидкості зсуву не більше 500 сек⁻¹ при температурі 25 °С. Потім програма автоматично розраховувала в'язкість; приводяться середні значення в'язкості від 200 до 500 сек⁻¹.

Кожний зразок аналізували тричі. Як контроль використовували кунжутну олію без засобу, який знижує в'язкість. У таблиці 4 наведені середні величини в'язкості для підготовлених прикладів несучих середовищ.

Зниження в'язкості одержаних несучих середовищ було пропорційне об'ємній або ваговій частці доданого засобу, який знижує в'язкість. Оскільки в присутніх на ринку продуктах для парентерального введення використовувалися кунжутна олія (SO), етилолеат (EO), етанол (EtOH) та ізопропіловий спирт (IPA), вони були вибрані для додаткового тестування.

Приклад 2

Одержання неводних концентрованих композицій зниженої в'язкості

Одержання частинок біоактивних молекул

Ліофілізація

Бичачий сироватковий альбумін (BCA) (Sigma-Aldrich, м. Сент-Луїс, штат Міссурі, США) і моноклональне антитіло (mAb) проти ФНО-α людини розчиняли в натрієвому фосфатному буферному розчині концентрації 6,5 мМ, рН 6,0, до концентрації білка 65 мг/мл. У розчин білка необов'язково додавали фармацевтично прийнятні експікенти, такі як сахароза і Твін 80 (або полісорбат 80, PS-80), до концентрації сахарози і Твін 80 в кінцевому розчині 0-9,0 % і 0-0,01 % (% в/об) відповідно. Розчин білка ліофілізували з використанням стандартних протоколів.

Порошок ліофілізованого білка або антитіла додатково подрібнювали в гомогенізаторі Уорінга і пропускали через послідовність сит із заданим розміром комірки. Процес подрібнення/просіювання забезпечував частинки білка або антитіла з розміром частинок 0,2-250 мкм.

Розпилювальне сушіння

Частинки бичачого сироваткового альбуміну (BCA) (Sigma-Aldrich, м. Сент-Луїс, штат Міссурі, США) і моноклональних антитіл проти ФНО-α людини одержали з використанням процесу розпилювального сушіння. Композиції (таблиця 5) висушували розпиленням з використанням розпилювача Yamato Mini при наступних параметрах пристрою: повітря розпилю: 2 psi, температура на вході: 120 °С, шкала аспілятора: 7,5, насос розчину: 2-4, основний клапан повітря: 40-45 psi. Середній діаметр (D50) висушених розпиленням частинок біоактивної молекули вимірювали лазерним дифракційним аналізатором розміру частинок (Malvern Mastersizer 2000, Malvern), в результаті були одержані частинки розміром в діапазоні 1~20 мкм. Приклади одержаних препаратів наведені в таблиці 5.

Таблиця 5

| Біоактивна молекула | Біоактивна молекула (мг/мл) | Сахароза (% в/об) | TWEEN® 80 (% в/об) |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| BCA | 65 | 5,5 | 0,0065 |
| BCA | 65 | 3 | 0,0065 |
| BCA | 100 | 4,5 | 0,0065 |
| mAb проти ФНО-α | 100 | 8,5 | 0,0065 |

Одержання неводних несучих середовищ

- 5 Кунжутну олію очищували порошком окису алюмінію для зниження рівня пероксидів і потім фільтрували через стерильні тefлонові фільтри з розміром пор 0,2 мкм. Засоби, що знижують в'язкість, додавали в кунжутну олію в концентрації 0,2-85 % об'єму (% об/об) або в ряді випадків використовували їх без кунжутної олії. Для деяких композицій в несуче середовище додавали етанол в кількості приблизно 0,2-10 % об'єму. Суміш вміщували в закритий контейнер і перемішували протягом однієї години при кімнатній температурі для утворення однорідного розчину. У таблиці 4 наведені одержані неводні несучі середовища.

Одержання композицій

- 15 Одержані неводні несучі середовища змішували з частинками біоактивних молекул, одержаних ліофілізацією або розпилювальним сушінням. Для змішування частинок з несучим середовищем використовували змішувач з плоскими лезами з нержавіючої сталі, змішування виконували при швидкості обертання 50-1000 об/хв при кімнатній температурі протягом 5~30 хв. Заповнення частинками становило приблизно 1-50 % ваг., що забезпечувало концентрацію білка в готовій композиції приблизно 10-500 мг/мл. Після утворення однорідної суспензії композиції вміщували в скляний шприц для ін'єкції. До ін'єкції композиції зберігали в холодильнику при температурі 4 °С. У таблиці 6 наведені одержані композиції.

Приклад 3

Стабільність ліофілізованих біоактивних молекул в неводних несучих середовищах

- 25 У кунжутну олію (SO) додавали етилолеат (EO) або тригліцерид з середньою довжиною ланцюгів (MCT; LABRAFAC™ Lipophile WL 1349, м. Гатфос, Франція) до концентрації 2-50 % об'єму. Суміш вміщували в закритий скляний флакон об'ємом 20 мл і перемішували на вортексі протягом 30 хвилин. Після повного перемішування наважки порошку ліофілізованого антитіла проти ФНО-α вміщували у вакуумну пробірку об'ємом 3 мл і додавали в пробірку відповідну кількість несучого середовища до кінцевої концентрації білка 10 або 20 % (% в/в), що відповідало концентрації антитіла проти ФНО-α 53,6 або 107,2 мг/мл відповідно.

- 30 Одержану суспензію гомогенізували короточасним перемішуванням на вортексі; потім пробірки герметично закривали. Приготовані суспензії зберігали при температурі 37 °С. Після одного і чотирьох тижнів зберігання відбирали зразки для аналізу.

Таблиця 6

| Склад несучого середовища (% об/об) | Несуче середовище (% в/в) | Білок | Концентрація білка (% в/в) | Концентрація білка мг/мл* |
|-------------------------------------|---------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|
| SO (100) | 60 | IL-12p40 mAb | 40 | 216,7 |
| EO (100) | 60 | ФНО-α mAb | 40 | 214,4 |
| EO (100) | 70 | ФНО-α mAb | 30 | 160,8 |
| EO (100) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| EO (100) | 90 | ФНО-α mAb | 10 | 53,6 |
| MCT (100) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| MCT (100) | 90 | ФНО-α mAb | 10 | 53,6 |
| SO (100) | 60 | ФНО-α mAb | 40 | 214,4 |
| SO (100) | 70 | ФНО-α mAb | 30 | 160,8 |
| SO (100) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| SO (100) | 90 | ФНО-α mAb | 10 | 53,6 |
| SO/EO (50/50) | 60 | ФНО-α mAb | 40 | 214,4 |
| SO/EO (50/50) | 70 | ФНО-α mAb | 30 | 160,8 |
| SO/EO (50/50) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| SO/EO (50/50) | 90 | ФНО-α mAb | 10 | 53,6 |

Таблиця 6

| Склад несучого середовища (% об/об) | Несуче середовище (% в/в) | Білок | Концентрація білка (% в/в) | Концентрація білка мг/мл* |
|-------------------------------------|---------------------------|-----------|----------------------------|---------------------------|
| SO/EO (50/50) | 95 | ФНО-α mAb | 5 | 26,8 |
| SO/EO (50/50) | 99 | ФНО-α mAb | 1 | 5,4 |
| SO/EO (72/28) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| SO/EO (72/28) | 90 | ФНО-α mAb | 10 | 53,6 |
| SO/EO(15/85) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| SO/EO(25/75) | 80 | ФНО-α mAb | 20 | 107,2 |
| SO (100) | 50 | БСА | 50 | 500,0 |
| SO (100) | 60 | БСА | 40 | 400,0 |
| SO (100) | 70 | БСА | 30 | 300,0 |
| SO (100) | 80 | БСА | 20 | 200,0 |
| SO (100) | 90 | БСА | 10 | 100,0 |
| SO (100) | 95 | БСА | 5 | 50,0 |
| SO (100) | 99 | БСА | 1 | 10,0 |
| SO/EO (50/50) | 50 | БСА | 50 | 500,0 |
| SO/EO (50/50) | 60 | БСА | 40 | 400,0 |
| SO/EO (50/50) | 70 | БСА | 30 | 300,0 |
| SO/EO (50/50) | 80 | БСА | 20 | 200,0 |
| SO/EO (50/50) | 90 | БСА | 10 | 100,0 |
| SO/EO (50/50) | 95 | БСА | 5 | 50,0 |
| SO/EO (50/50) | 99 | БСА | 1 | 10,0 |
| SO/EO (72/28) | 80 | БСА | 20 | 200,0 |
| EO (100) | 50 | БСА | 50 | 500,0 |
| EO (100) | 60 | БСА | 40 | 400,0 |
| EO (100) | 70 | БСА | 30 | 300,0 |
| EO (100) | 80 | БСА | 20 | 200,0 |
| EO (100) | 90 | БСА | 10 | 100,0 |
| EO (100) | 95 | БСА | 5 | 50,0 |
| EO (100) | 99 | БСА | 1 | 10,0 |
| МСТ | 80 | БСА | 20 | 200,0 |

*кінцева концентрація в суспензійній композиції

Коротко, в пробірки додавали 1 мл охолодженої до температури -20 °C 1:1 суміші ацетон/дихлорметан і вміст пробірки перемішували на шейкері при температурі 4 °C протягом 20 хвилин. Потім пробірку центрифугували протягом 4 хвилин на 2900g і видаляли супернатант. Процес екстрагування повторювали двічі і білковий осад сушили протягом 2 годин з використанням вакуумного концентратора SpeedVac. Потім осад розчиняли в рухомій фазі (0,2 М фосфатного буферного розчину, pH 6,8) до робочої концентрації 10 мг/мл. 20 мкл одержаного розчину вводили в систему ексклюзійної хроматографії Agilent SEC-HPLC з швидкістю потоку 1 мл/хв. Нативні, агреговані і фрагментовані форми антитіл проти ФНО-α розділяли на колонці BioSil SEC250 (BioRad, м. Геркулес, штат Каліфорнія, США) і детектували на довжинах хвиль 214 і 280 нм на ексклюзійному хроматографі (SEC).

Стабільність при зберіганні перевірених суспензійних композицій, що містять частинки антитіл проти ФНО-α, наведена на фіг. 1 і виміряна як відносна частка вмісту мономера (наприклад, нативного mAb), що залишився в зразку. Як контроль приготували і проаналізували водні композиції, що містять mAb проти ФНО-α в ФСБ при pH 7,4. Кожна неводна суспензійна композиція мала вищу стабільність в порівнянні з водною композицією, при цьому вони були порівнянні з порошками ліофілізованого білка в термінах вмісту мономерного білка при однакових умовах навантаження. Додавання засобу, який знижує в'язкість, етилолеату (ЕО) в кунжутну олію або заміна кунжутної олії на тригліцерид з середньою довжиною ланцюгів (МСТ), такою як Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Gattefosse), не надавало впливу на стабільність білка протягом зберігання протягом 4 тижнів.

Приклад 4

На характеристики ін'єкційного введення концентрованих композицій впливає склад

несучого середовища, концентрація білка і розмір частинок.

Як оцінка для вимірювання впливу різних параметрів на характеристики ін'єкційного введення неводних концентрованих суспензійних композицій даного винаходу використовували вимірювання зусилля переміщення поршня (наприклад, зусилля ін'єкції).

5 Вплив складу несучого середовища

Характеристики ін'єкційного введення композицій, що містять 20 % (% в/в) БСА і 20 % (% в/в) антитіл проти ФНО- α , шляхом вимірювання зусилля, необхідного для проштовхування суспензії через голку заданого розміру з використанням випробувального інструмента Zwick/Roell (модель 2005). Частинки БСА одержали розпилювальним сушінням розчину 100
10 мг/мл БСА у воді, а частинки mAb проти ФНО- α одержали розпилювальним сушінням розчину 65 мг/мл білка, 55 мг/мл сахарози, 10 mM L-гістидину, 0,01 % PS-80, pH 5,5. Білкові композиції одержали шляхом змішування білкових частинок, як описано вище, з кунжутною олією, що містить збільшувані кількості об'єму засобу, який знижує в'язкість, етилолеату (0 %, 3 %, 9,5 %, 17 %, 20 %, 25 %, 28 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 85 % або 100 % (% об/об)). Приготовані
15 композиції потім вмістили в шприци виробництва компанії BD (Becton, Dickinson and Company, штат Нью-Джерсі, США) (BD Нурак SCF™, попередньо наповнюваний скляний шприц з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл зі встановленою на нього голкою розміру 26½ довжиною 1,3 см (0,5 дюйми) (код продукту PIR6-001 SCF1MLL 26GA1/2 RNSFM27 EB LTP. 8268589)). Шприци заповнили приблизно 0,5 куб.см. композиції, швидкість ін'єкції
20 встановлювали такою, що дорівнює приблизно 250 мм/хвилина, якщо інше не вказано спеціально, і реєстрували зусилля переміщення поршня. Ін'єкційне тестування проводили при кімнатній температурі.

Збільшення кількості етилолеату (EO) в кунжутній олії (SO) приводило до значного зниження зусилля ін'єкції і тим самим поліпшувало характеристики ін'єкційного введення суспензійних композицій для частинок білка розміром як 2 мкм, так і 13 мкм. Зусилля ін'єкції для суспензії
25 20 % (в/в) (200 мг/мл) частинок БСА розміром 2 мкм становило в EO/SO/28/72 35,3 Н і в EO/SO/50/50 21,5 Н, де останнє являє собою 67 % зниження в порівнянні з тим, що використовується як контроль кунжутною олією без додавання засобу, який знижує в'язкість (64,65 Н) (Фіг. 2А). Використання як несуче середовище 100 % EO додатково знизило зусилля
30 ін'єкції до 12,1 Н. Аналогічне зниження зусилля ін'єкції було одержане для композицій, що містять mAb проти ФНО- α при підвищенні кількості етилолеату в кунжутній олії. Наприклад, зусилля ін'єкції для суспензії 20 % (в/в) (108,6 мг/мл) частинок розміром 3,1 мкм mAb проти ФНО- α в EO/SO/50/50 зменшилося до 29,5 Н і в EO/SO/70/30 - до 21,1 Н від зусилля ін'єкції 71,3 Н для 20 % (в/в) mAb проти ФНО- α в SO (Фіг. 2В). Одержані результати показують, що
35 додавання засобу, який знижує в'язкість, в несуче середовище значно поліпшує характеристики ін'єкційного введення неводних концентрованих суспензійних композицій шляхом зниження зусилля ін'єкції. Таким чином, можна виготовляти неводні концентровані суспензійні композиції, що мають зусилля ін'єкції приблизно 45 Н або менше, шляхом збільшення кількості етилолеату в використовуваних як несуче середовище композиціях, що містять кунжутну олію, до 28 %
40 об'єму або більше.

Вплив концентрації білка

Концентрація білка в неводних суспензійних композиціях впливала на зусилля ін'єкції. На фіг. 3А показаний комбінований вплив збільшення концентрації частинок розміром 8,2 мкм антитіл проти ФНО- α (20-40 % (% в/в); 108,3-216,7 мг/мл) і збільшення кількості засобу, який
45 знижує в'язкість, на зусилля ін'єкції композицій. По осі Х вказана концентрація антитіла проти ФНО- α , використовувана в кожному експерименті. Використання концентрації mAb до 30 % в EO/SO/50/50 привело до одержання зусилля ін'єкції 42,8 Н. Зусилля ін'єкції при цій концентрації антитіла можна було знизити до 20,5 Н при використанні як несуче середовище 100 % EO. На фіг. 3В показаний вплив підвищення концентрації mAb проти ФНО- α (0-40 % (% в/в); 0-216,7
50 мг/мл) в композиціях EO/SO/50/50 на зусилля ін'єкції і на в'язкість. На фіг. 3В показаний вплив підвищення концентрації БСА (розмір частинок 2 мкм, 0-40 % (% в/в); 0-400 мг/мл) в 100 % SO, EO/SO/50/50 і в 100 % EO. Щоб знизити зусилля ін'єкції до приблизно 45 Н або нижче, композиції можуть містити приблизно 20 % (% в/в) або менше білка і щонайменше 28 % EO в несучому середовищі, 30 % або менше білка і щонайменше 50 % EO в несучому середовищі,
55 або мати концентрацію білка приблизно 40 % або менше в 100 % EO. Проведені експерименти також показали, що зусилля ін'єкції і в'язкість неводних концентрованих суспензійних композицій корелюють одне з одним. На фіг. 4А показана така кореляція для суспензійних композицій, що містять 20 % (% в/в) mAb проти ФНО- α . На фіг. 4В показана така кореляція для всіх перевірених суспензійних композицій, що містять mAb проти ФНО- α . Таким чином, зусилля ін'єкції можна
60 використовувати як ступінь в'язкості, так і ступінь характеристик ін'єкційного введення.

Відповідне корегування як концентрації білка, так і кількості засобу, який знижує в'язкість, в неводних концентрованих суспензійних композиціях позитивно позначається на характеристиках ін'єкційного введення композицій.

Вплив розміру частинок

Вплив розміру частинок на характеристики ін'єкційного введення оцінювали шляхом вимірювання впливу різних розмірів частинок на зусилля ін'єкції композицій, що перевіряються. Приготували композиції, що містять частинки БСА розміром 2 мкм і 13 мкм в діапазоні концентрацій 1-50 % (% в/в) (10-500 мг/мл) в несучому середовищі EO/SO/50/50. У таких композиціях зусилля ін'єкції зростало із збільшенням концентрації білка і падало зі зменшенням розміру частинок (Фіг. 5). Наприклад, для одержання зусилля ін'єкції 45 Н або менше можна використовувати композиції з 40 % (% в/в) білка у вигляді частинок розміром 13 мкм в EO/SO/50/50. Збереження сумарної маси частинок в суспензії при збільшенні розміру окремих частинок твердої фази приводить до зменшення числа частинок в системі. Тому в суспензіях з частинками більшого розміру послаблюється міжчастинкова взаємодія і зменшується опір течії, що приводить до зниження зусилля ін'єкції. Одержані результати показують, що при високих концентраціях білка, таких як 40 % (% в/в), вибір розміру частинок в неводних суспензійних композиціях впливає значним чином на зусилля ін'єкції і тим самим на характеристики ін'єкційного введення композицій. Наприклад, композиції з 40 % (5 в/в) білка у вигляді частинок розміром 13 мкм мають зусилля ін'єкції 40,5 Н, тоді як ті ж композиції з частинками білка розміром 2 мкм мають зусилля ін'єкції 57 Н. Таким чином, характеристики ін'єкційного введення суспензійних композицій даного винаходу можна поліпшити шляхом оптимізації як концентрації білка, так і розміру частинок, а також кількості засобу, який знижує в'язкість, в композиціях.

Приклад 5

В'язкість неводних концентрованих суспензійних композицій можна знизити підвищенням швидкості зсуву

Вивчили вплив вибору несучого середовища і концентрації білка на в'язкість при варіюванні швидкості зсуву. 290 мкл композицій, що містять 1-40 % (% в/в) антитіла проти ФНО- α в EO/SO/50/50 або в SO піпетували в реометр AR2000 (TA Instruments) з встановленим акриловим конусом розміром 40 мм, кутом 1°. Провели скануюче вимірювання в'язкості при температурі 25 °C при збільшенні швидкості зсуву від $\sim 8 \text{ сек}^{-1}$ до 5000 сек^{-1} .

Залежно від використовуваного несучого середовища, композиції з 20 % (% в/в) mAb проти ФНО- α показали або ньютонівську поведінку (mAb проти ФНО- α в EO/SO/50/50), або неньютонівське розрідження при зсуві (mAb проти ФНО- α в SO) (Фіг. 6A). При концентрації білка 30 % (% в/в) або вище композиції mAb проти ФНО- α в EO/SO/50/50 змінювали свої характеристики з ньютонівської поведінки на неньютонівське розрідження при зсуві (Фіг. 6B).

Оцінка розрідження при зсуві композицій даного винаходу критично важлива для їх подальшої обробки і виробництва. Концентровані білкові композиції часто приводять до підвищеної в'язкості, що створює значні труднощі при їх обробці, виробництві і зберіганні. Як показано на фіг. 6A і 6B, оцінка впливу швидкості зсуву на в'язкість і відповідне збільшення швидкості зсуву в процесі обробки і виробництва композицій даного винаходу може значно знизити в'язкість і тим самим підвищити оброблюваність композицій.

Приклад 6

Корекція швидкості ін'єкції для модифікації зусилля ін'єкції

Зусилля ін'єкції оцінювали для композицій БСА в концентрації 40-50 % (% в/в) (400-500 мг/мл) з частинками розміром 2 мкм і 13 мкм в EO (фіг. 7A, 7B) і для композицій антитіла проти ФНО- α в концентрації 20-40 % (% в/в) (108,33-216,67 мг/мл) в EO/SO/50/50 (Фіг. 7B) при різних швидкостях ін'єкції. Швидкість ін'єкції впливала на зусилля ін'єкції що залежить від концентрації білка чином. При концентрації БСА 40 % (% в/в) зусилля ін'єкції менше залежало від швидкості ін'єкції. Однак при концентрації БСА 50 % (% в/в) зниження швидкості ін'єкції з 250 мм/хв до 50 мм/хв значно знизило зусилля ін'єкції, з 111,4 Н до 32,4 Н (Фіг. 7A). Вплив швидкості ін'єкції на зусилля ін'єкції також залежав від розміру частинок. Зусилля ін'єкції для композицій з великим розміром частинок менше залежало від швидкості ін'єкції, тоді як зусилля ін'єкції для композицій з меншим розміром частинок значно залежало від швидкості ін'єкції (Фіг. 7B). Використання частинок БСА розміром 13 мкм при швидкостях ін'єкції в діапазоні 50-250 мм/хв забезпечило зусилля ін'єкції 45 Н або менше. Швидкість ін'єкції також впливала на зусилля ін'єкції композицій антитіла проти ФНО- α , зниження швидкості ін'єкції приводило до зниження зусилля ін'єкції (Фіг. 7B).

Приклад 7

Оптимізація композицій для сухих частинок

Приготували композиції на основі антитіла проти ФНО- α CNT0148, такі як наведені в

таблиці 7, з використанням розпилювального сушіння або ліофілізації, як описано в прикладі 2. Композиції для розпилювального сушіння або ліофілізації CNTO148 можуть включати в себе один або більше з наступних ексципієнтів: сахароза при співвідношенні сахароза:білок в діапазоні приблизно 0-3, сахароза + амінокислота при співвідношенні (сахароза+амінокислота):білок в діапазоні приблизно 0-3, приблизно 0-40 мМ гістидинового буферного розчину, приблизно 0-10 мМ цитратного буферного розчину, трегалоза при співвідношенні трегалоза:білок в діапазоні приблизно 0-1,8, маніт при співвідношенні маніт:білок в діапазоні приблизно 0-1,8, сорбіт при співвідношенні сорбіт:білок в діапазоні приблизно 0-1,8, амінокислота при співвідношенні (амінокислота):білок в діапазоні приблизно 0-1,8; де вказані вище співвідношення наведені як в/в співвідношення, і приблизно 0,01-0,1 % PS-80 (% в/об). рН можна довести до приблизно 5,5.

Таблиця 7

| Експеримент | Номер композиції | Опис |
|-------------|------------------|--|
| SD_1 | Комп-1 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_1 | Комп-5 | 16,25 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_1 | Комп-7 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-1 | 65 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-2 | 32 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-3 | 32 мг/мл біл., 10 мМ His, 5 мг/мл Suc и 22,5 Man, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-4 | 32 мг/мл біл., 10 мМ His, 18 мг/мл Suc/9 мг/мл Met, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-5 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-6 | 32 мг/мл біл., 5 мМ His/5 мМ Cit, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-7 | 32 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-8 | 32 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_2 | Комп-9 | 32 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 13,8 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| Ліо | 1 | 65 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| Ліо | 2 | 32 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 3 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 4 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 32,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 5 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 13,75 мг/мл Suc, 13,75 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 6 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 7 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 8 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 32 мг/мл Suc, 12 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 9 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 20,5 мг/мл Suc, 7 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 10 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 11 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 7 мг/мл Suc, 20,5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 12 | 32 мг/мл біл., 10 мМ His, 13,75 мг/мл Suc, 13,75 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 13 | 16 мг/мл біл., 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 (автобуфер) |
| Ліо | 14 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Sor, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 15 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Tre, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 16 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Sor, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 17 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Tre, 0,01 % PS-80 |

Таблиця 7

| Експеримент | Номер композиції | Опис |
|-------------|------------------|--|
| Ліо | 18 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Tre, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 19 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 13,75 мг/мл Suc, 13,75 мг/мл Tre, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 20 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 5 мг/мл Suc, 22,5 мг/мл Tre, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 21 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Ile, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 22 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Ile, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 23 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Arg 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 24 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Gly, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 25 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 22,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Lis, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 26 | 16 мг/мл біл., 5 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 27 | 16 мг/мл біл., 20 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 28 | 16 мг/мл біл., 40 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 29 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Pro, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 30 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 5 мг/мл Pro, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 31 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,02 % PS-80 |
| Ліо | 32 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,05 % PS-80 |
| Ліо | 33 | 16 мг/мл біл., 10 мМ His, 27,5 мг/мл Suc, 0,1 % PS-80 |
| Ліо | 34 | 16 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 5 мг/мл Suc, 22,5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 35 | 16 мг/мл біл., 5 мМ His, 5 мМ Cit, 5 мг/мл Suc, 22,5 мг/мл Man, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 36 | 16 мг/мл біл., 10 мМ Cit, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| Ліо | 37 | 16 мг/мл біл., 5 мМ Cit, 27,5 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80 |
| SD_3 | Комп-1 | 65 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-2 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 65 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-3 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 97 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-4 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Suc, 10 мг/мл Ile, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-5 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 65 мг/мл Suc, 0,1 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-6 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 60 мг/мл Suc, 5 мг/мл Sor, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-7 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Suc, 10 мг/мл Sor, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-8 | 32,5 мг/мл біл., 10 мМ His, 55 мг/мл Tre, 10 мг/мл Sor, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| SD_3 | Комп-9 | 32,5 мг/мл біл., 5 мМ His/5 мМ Cit, 65 мг/мл Suc, 0,01 % PS-80, pH 5,5 |
| | | His=гістидин; Cit=цитрат; Suc=сахароза, Man=маніт; Sor=сорбіт |
| | | Tre=трегалоза; Ile=ізолейцин; Arg=аргінин; Gly=гліцин; Lys=лізин |
| | | Pro=пролін |

Деякі композиції, наведені в таблиці 7, перевірили на стабільність при зберіганні протягом 0-6 місяців при температурі 5 °С, 25 °С або 40 °С. Вибрані композиції суспендували в неводних несучих середовищах для додаткового дослідження в прикладі 8.

5 Приклад 8

Суспензійні композиції на основі CNTO148

Вибрані композиції з прикладу 7 суспендували в концентрації 100 мг/мл або 200 мг/мл в неводних несучих середовищах SO, EO або EO/SO/50/50 (таблиця 8). Стабільність одержаних розпилювальним сушінням і суспензійних композицій перевірили через 0, 1, 2, 3, 4, 5 і 6 місяців зберігання при температурах 5 °C, 25 °C або 40 °C з використанням ексклюзивної ВЕРХ (SE-HPLC), капілярного гелі-електрофореза ДСН-ПААГ, капілярного ізоелектричного фокусування (cIEF), вимірювання кругового дихроїзму (CD) або мас-спектрометричного картирування білків. Вибрані композиції обробляли окисом алюмінію для видалення пероксидів з використанням стандартних способів. В експериментах по SE-HPLC як індикатор стабільності антитіл CNTO148 в складі композиції оцінювали відносну частку збереження основного ВЕРХ піка з часом.

Таблиця 8

| SD композиції | Опис | Суспензії |
|---------------|--|--------------------|
| Комп-1 | 32,5 мг/мл білка, 10 мМ гістидину, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, pH 5,5 (SD при загальній кількості твердих речовин 6 %) | 200 мг/мл в SO |
| | | 200 мг/мл в SO/EO |
| | | 200 мг/мл в EO |
| | | 100 мг/мл в SO |
| | | 100 мг/мл в SO/EO |
| Комп-5 | 16,25 мг/мл білка, 10 мМ гістидину, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, pH 5,5 (SD при загальній кількості твердих речовин 4,3 %) | 100 мг/мл в SO |
| | | 100 мг/мл в SO/EO* |
| Комп-7 | 32,5 мг/мл білка, 10 мМ цитрата, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, pH 5,5 (SD при загальній кількості твердих речовин 6 %) | 200 мг/мл в SO/EO |
| | | 200 мг/мл в EO |
| | | 100 мг/мл в SO/EO |
| | | 100 мг/мл в SO/EO* |

*(без обробки по видаленню пероксидів)

На фіг. 8A і 8B і фіг. 9A і 9B показана стабільність вибраних одержаних розпилювальним сушінням композицій і їх суспензій в SO, EO і SO/EO/50/50 після зберігання при температурі 25 °C (фіг. 8A і 8B) і 40 °C (фіг. 9A і 9B) протягом до 6 місяців за результатами оцінки стабільності основного піка на хроматограмі SE-HPLC. Композиції загалом групуються по типу одержаної розпилювальним сушінням (SD) композиції (Комп-1 в порівнянні з Комп-5 в порівнянні з Комп-7 для експерименту SD_1 в таблиці 7), що вказує на потенційно менший ефект відносно завантаження і складу несучого середовища на стабільній кінцевій композиції при хроматографічній оцінці з використанням SE-HPLC. Як композиції, одержані розпилювальним сушінням (SD), так і суспензійні композиції виявилися стабільнішими в порівнянні з контрольними водними композиціями (101 мг/мл білка, 10 мМ гістидину, 4,5 мг/мл сахарози, 0,015 % PS-80, pH 5,6).

Біоактивність CNTO148 (інгібовані активності ФНО-α на клітинах, що визначається з використанням стандартних способів) вимірювали на початку і після зберігання при температурі 25 °C аж до 6 місяців і після зберігання при температурі 40 °C аж до 4,5 місяців для одержаних розпилювальним сушінням композицій і суспензійних композицій з концентрацією 100 мг/мл в SO/EO/50/50. Біоактивність CNTO148 зберігалася після розпилювального сушіння і в одержаних розпилювальним сушінням композиціях після 6 місяців зберігання при температурі 25 °C, а також в суспензійних композиціях (Фіг. 10).

Можливі зміни у вторинній структурі білків в одержаних розпилювальним сушінням і суспензійних композиціях оцінювали з використанням спектра оптичного поглинання в далекій УФ-зоні (Фіг. 11). Ніяких змін після розпилювального сушіння або після зберігання як одержаних розпилювальним сушінням композицій, так і суспензійних композицій не виявлено.

Приклад 9

Композиції на основі CNTO148

У прикладах 1-7 як антитіло проти ФНО-α використовували CNTO148. Приготували наведені в таблиці 9 додаткові суспензійні композиції на основі CNTO148 з використанням одержаних розпилювальним сушінням композицій CNTO148, описаних в прикладі 7. Для одержаних суспензійних композицій оцінюються стабільність і характеристики ін'єкційного введення з використанням способів, описаних в цьому документі.

Таблиця 9

| Склад несучого середовища (% об/об) | Концентрації CNTO148 в несучому середовищі (% в/в) | Концентрація CNTO148, мг/мл* |
|-------------------------------------|--|--|
| EO (100) | 10, 20, 30 50, 60 | 53,6, 107,2, 160,8, 268,0, 321,6 |
| SO/EO (5/95) | 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 | 5,4, 26,8, 53,6, 107,2, 160,8, 214,4, 268,0, 321,6 |
| SO/EO (10/90) | 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 | 5,4, 26,8, 53,6, 107,2, 160,8, 214,4, 268,0, 321,6 |
| SO/EO(15/85) | 1, 5, 10, 30, 40, 50, 60 | 5,4, 26,8, 53,6, 160,8, 214,4, 268,0, 321,6 |
| SO/EO(25/75) | 1, 5, 10, 30, 40, 50, 60 | 5,4, 26,8, 53,6, 160,8, 214,4, 268,0, 321,6 |
| SO/EO(30/70) | 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 | 5,4, 26,8, 53,6, 107,2, 160,8, 214,4, 268,0, 321,6 |
| SO/EO (50/50) | 50, 60 | 268,0, 321,6 |

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> Janssen Biotech, Inc.
 Dao, Weiguo
 Hill, Beth
 Liu, Kui
 Mieczkowski, Carl
- <120> НЕВОДНІ КОНЦЕНТРОВАНІ СУСПЕНЗІЙНІ КОМПОЗИЦІЇ З ПОНИЖЕНОЮ
 В'ЯЗКИСТЮ НА ОСНОВІ АНТИТІЛ
- <130> CEN5287WOPCT1
- <140> ПЕРЕУСТУПКА ПРАВ
 <141> 30.09.2011 р.
- <150> 13/043925
 <151> 09.03.2011 р.
- <150> 61/311896
 <151> 09.03.2010 р.
- <160> 9
- <170> PatentIn, версія 3.5
- <210> 1
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- <400> 1
- Gln val Gln Leu val Glu Ser Gly Gly Gly val val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
- Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
- Ala Met His Trp val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp val
 35 40 45
- Ala Ile Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Ser Lys Lys Tyr Ala Asp Ser val
 50 55 60
- Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
- Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
- Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
- Met Asp val Trp Gly Gln Gly Thr Thr val Thr val Ser Ser
 115 120 125
- <210> 2
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Val Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 4
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 5
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Ile Gly Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Неводна суспензійна композиція високої концентрації, яка складається з:
 - а) несучого середовища, що містить кунжутну олію як гідрофобний засіб і етилолеат як засіб, який знижує в'язкість; і

b) антитіла в суміші з ексципієнтом, де антитілом є антитіло проти ФНО- α , яке містить варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) з SEQ ID NO: 7 (VH) і варіабельну ділянку важкого ланцюга з SEQ ID NO: 4.

2. Композиція за п. 1, в якій кількість засобу, який знижує в'язкість, в складі несучого середовища знаходиться в діапазоні 0,2-95 % об'єму (% об./об.) несучого середовища.

3. Композиція за п. 2, в якій антитіло проти ФНО- α присутнє в концентрації приблизно 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 або 60 % ваг. (% ваг./ваг.) композиції.

4. Композиція за п. 3, в якій антитіло проти ФНО- α висушене розпиленням або ліофілізоване.

5. Композиція за п. 4, в якій антитіло проти ФНО- α належить до типу IgG1/к.

6. Композиція за п. 1, в якій зусилля ін'єкції композиції становить 45 Ньютонів (Н) або менше, причому зусилля ін'єкції вимірюють за допомогою скляного шприца з голкою в твердому захисному ковпачку об'ємом 1 мл, що має внутрішній діаметр 0,65 см, з встановленою на ньому голкою розміру 26½ довжиною 1,3 см при швидкості ін'єкції 250 мм/хв.

7. Композиція за п. 1, яка стабільна при температурі 40 °C протягом щонайменше одного місяця.

8. Композиція за п. 1, в якій ексципієнт являє собою вуглевод, амінокислоту, буферний розчин або неіонну поверхнево-активну речовину.

9. Композиція за п. 8, в якій вуглевод являє собою сахарозу, трегалозу, маніт або сорбіт, амінокислота являє собою гістидин, ізолейцин, метіонін, гліцин, аргінін або лізин, буферний розчин являє собою гістидиновий буферний розчин або цитратний буферний розчин, і неіонна поверхнево-активна речовина являє собою PS-80.

10. Композиція за п. 8, в якій вагове співвідношення (ваг./ваг.) вуглеводу і антитіла проти ФНО- α знаходиться в діапазоні приблизно 0-3 або приблизно 1-2, вагове співвідношення амінокислоти і антитіла проти ФНО- α знаходиться в діапазоні приблизно 0-2 або приблизно 0,3-1,8, концентрація гістидинового буферного розчину становить приблизно 0-40 мМ або приблизно 5-10 мМ, концентрація цитратного буферного розчину становить приблизно 0-10 мМ або приблизно 5-10 мМ, і неіонна поверхнево-активна речовина присутня в концентрації приблизно 0-0,5 % (% ваг./об.) або приблизно 0,01-0,1 % (% ваг./об.).

11. Суспензійна композиція, що містить композицію частинок антитіла проти ФНО- α , що має VL з SEQ ID NO: 7 і VH з SEQ ID NO: 4, яка складається з:

a) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;

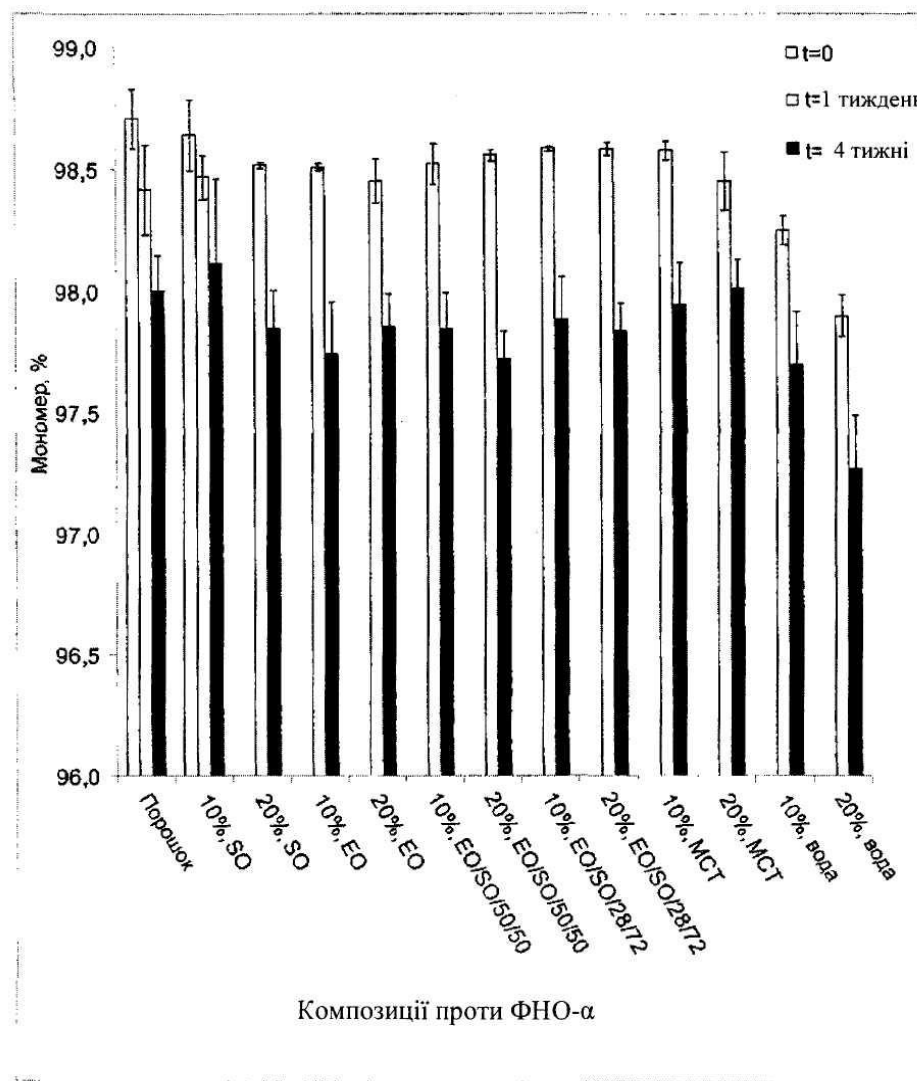
b) 16,25 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;

c) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ цитрату, 27,5 мг/мл сахарози, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;

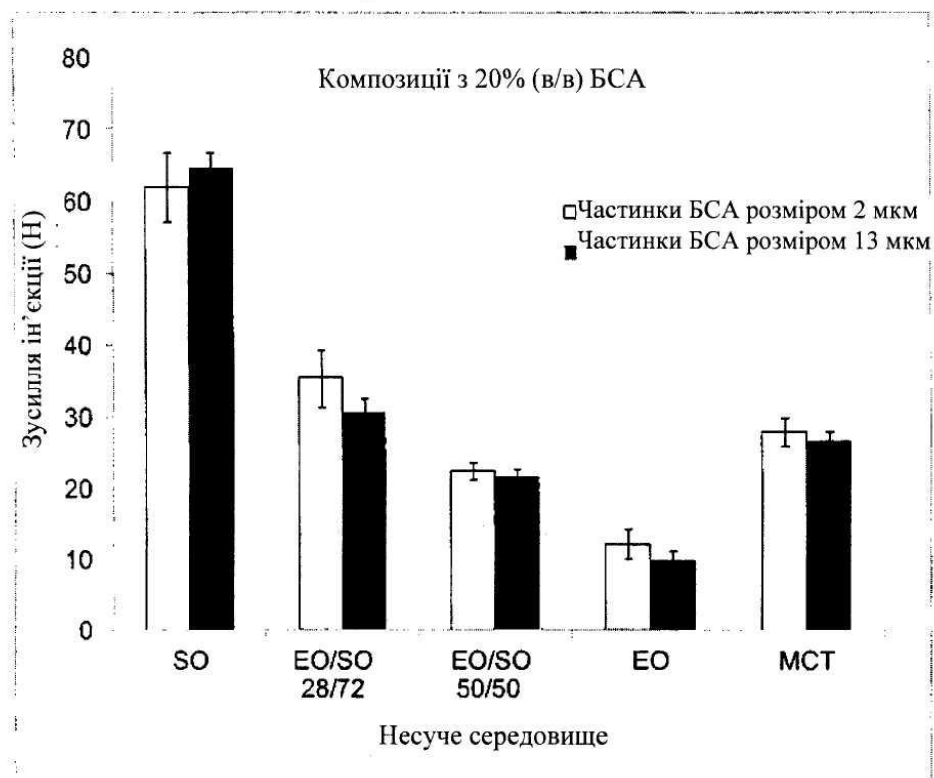
d) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 55 мг/мл сахарози, 10 мг/мл ізолейцину, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;

e) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 65 мг/мл сахарози, 0,01% (% ваг./об.) PS-80;

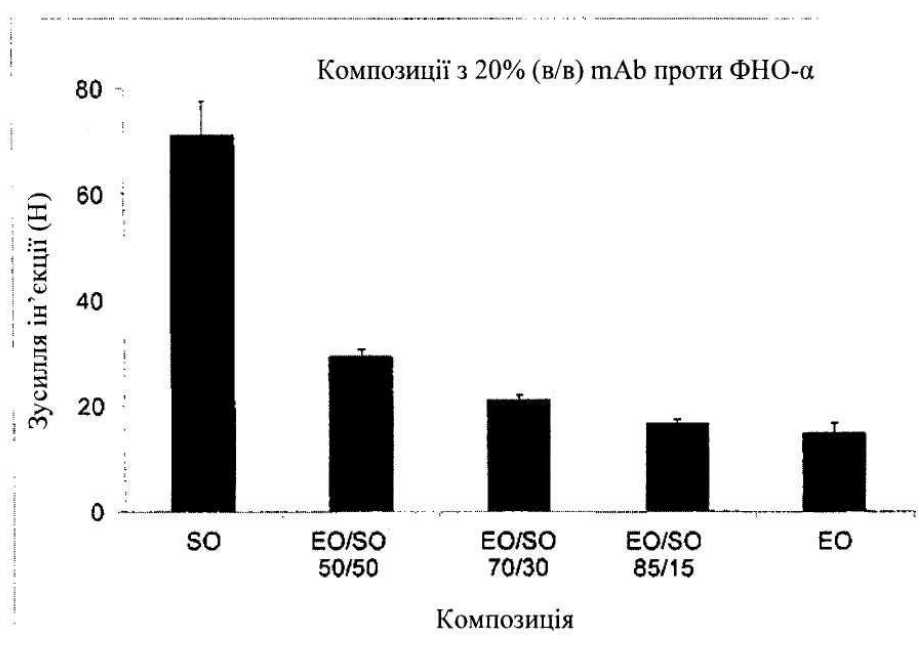
- f) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 5 мМ гістидину, 5 мМ цитрату, 65 мг/мл сахарози, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;
- g) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 5 мг/мл сахарози, 22,5 мг/мл маніту, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80;
- 5 h) 32,5 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 55 мг/мл трегалози, 10 мг/мл ізолейцину, 0,01 % (% ваг./об.) PS-80; або
- i) 65 мг/мл антитіла проти ФНО- α , 10 мМ гістидину, 55 мг/мл сахарози, 0,01 % PS-80, причому композиції, вказані в а)-і), дисперговані в неводному несучому середовищі, що містить кунжутну олію і етилолеат, причому кількість етилолеату в несучому середовищі знаходиться в
- 10 діапазоні 0,2-95 % об'єму (% об./об.) неводного несучого середовища.
12. Суспензійна композиція за п. 11, в якій кількість етилолеату в несучому середовищі становить 5, 10, 15, 30 або 50 % (% об./об.) неводного середовища.
13. Суспензійна композиція за п. 11, в якій антитіло проти ФНО- α належить до типу IgG1/к.



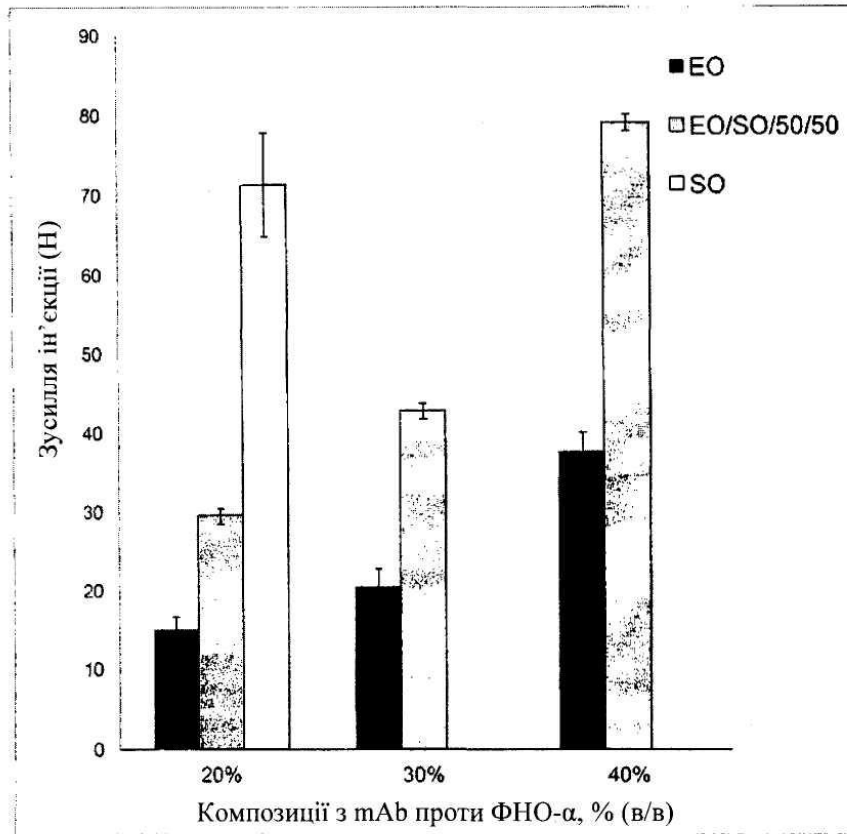
Фіг. 1



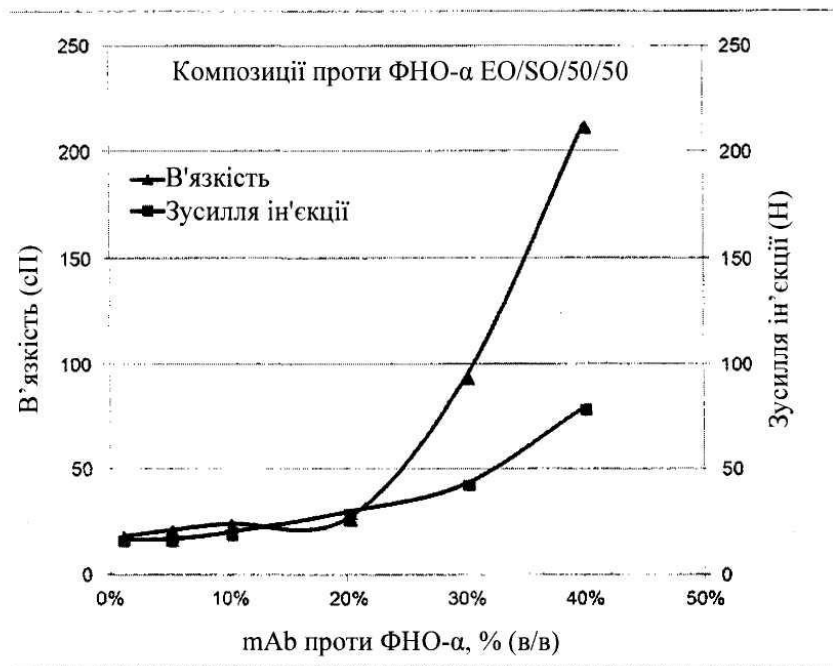
Фіг. 2А



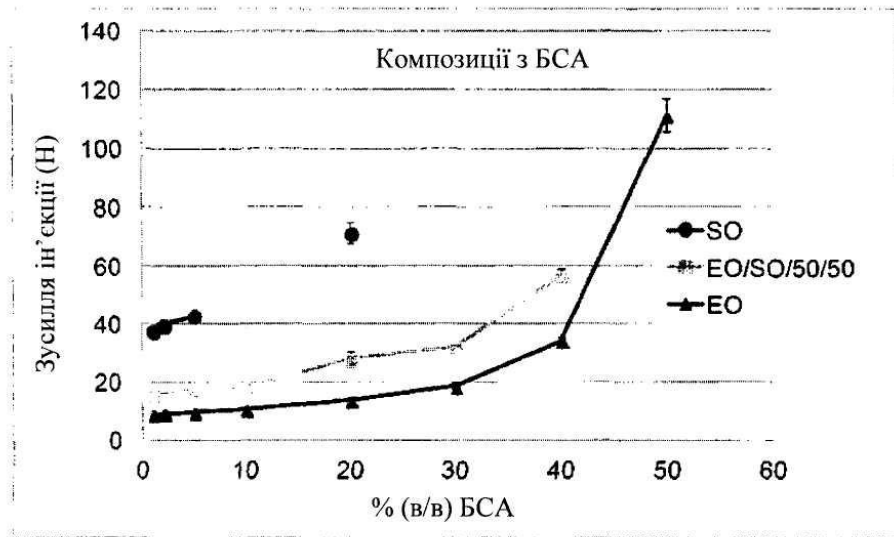
Фіг. 2В



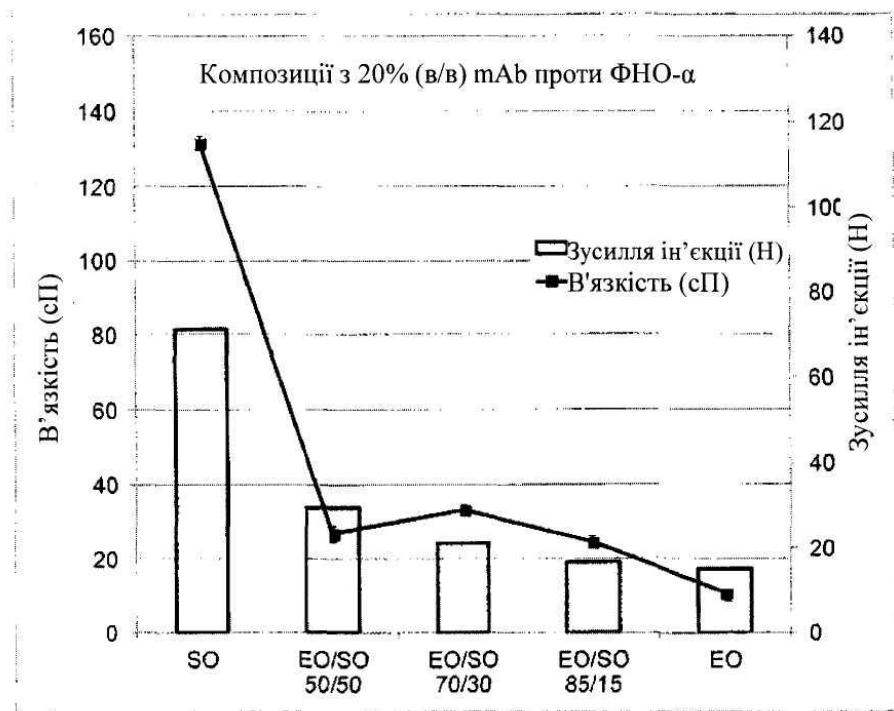
Фіг. 3А



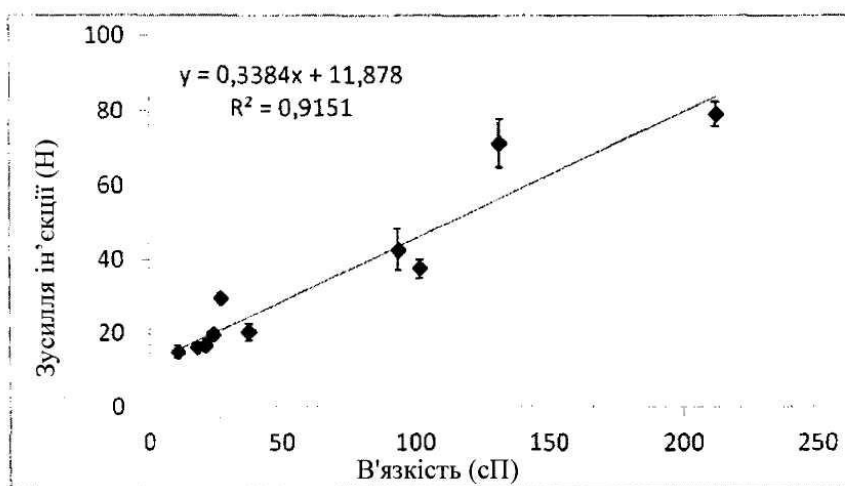
Фіг. 3В



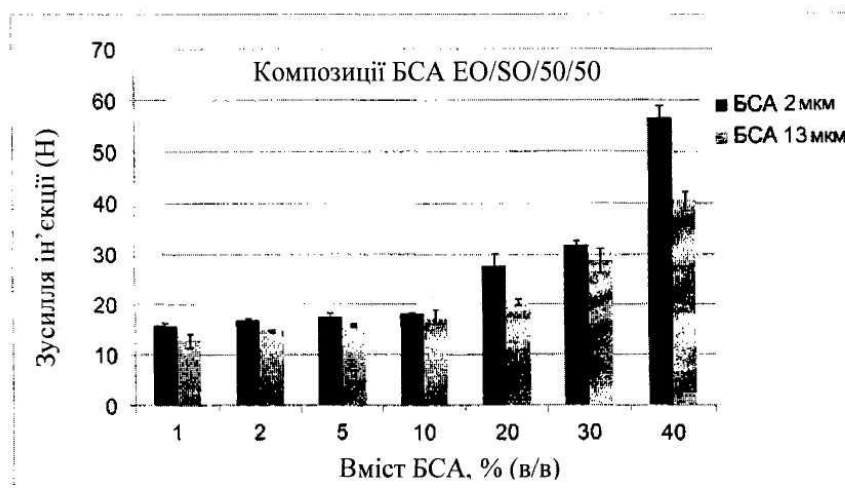
Фіг. 3С



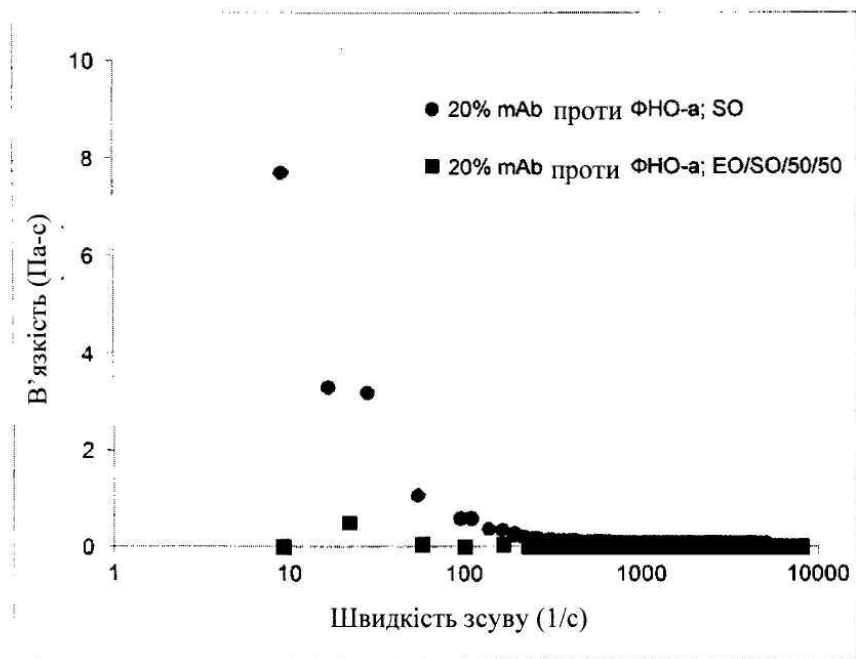
Фіг. 4А



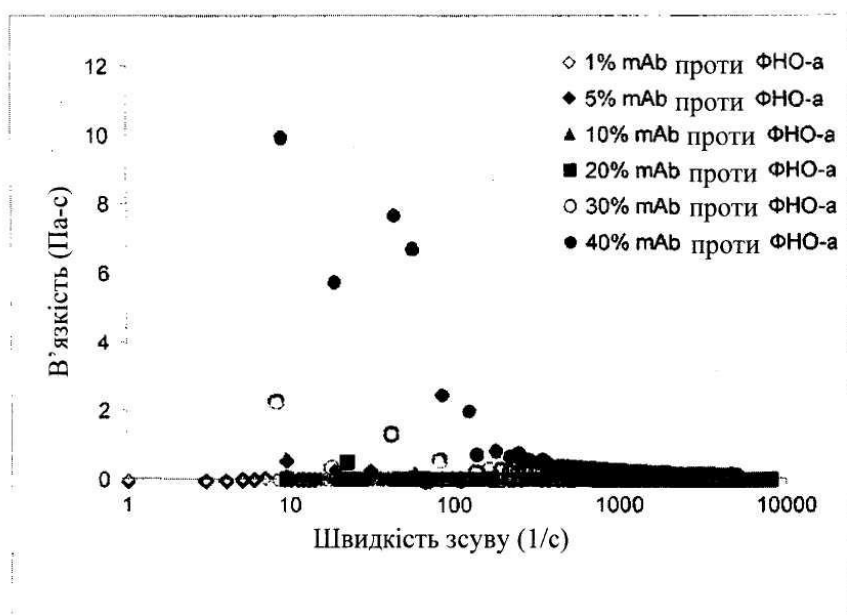
Фіг. 4В



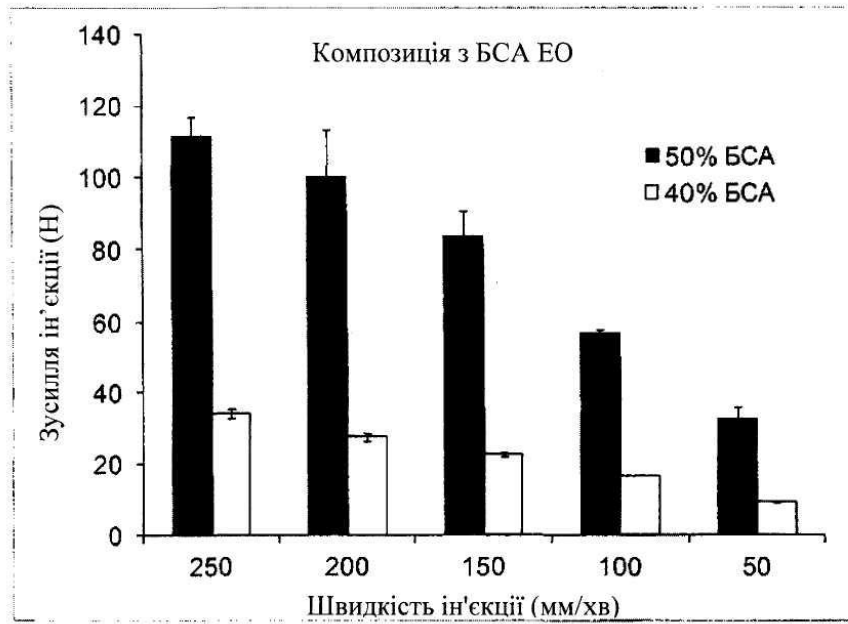
Фіг. 5



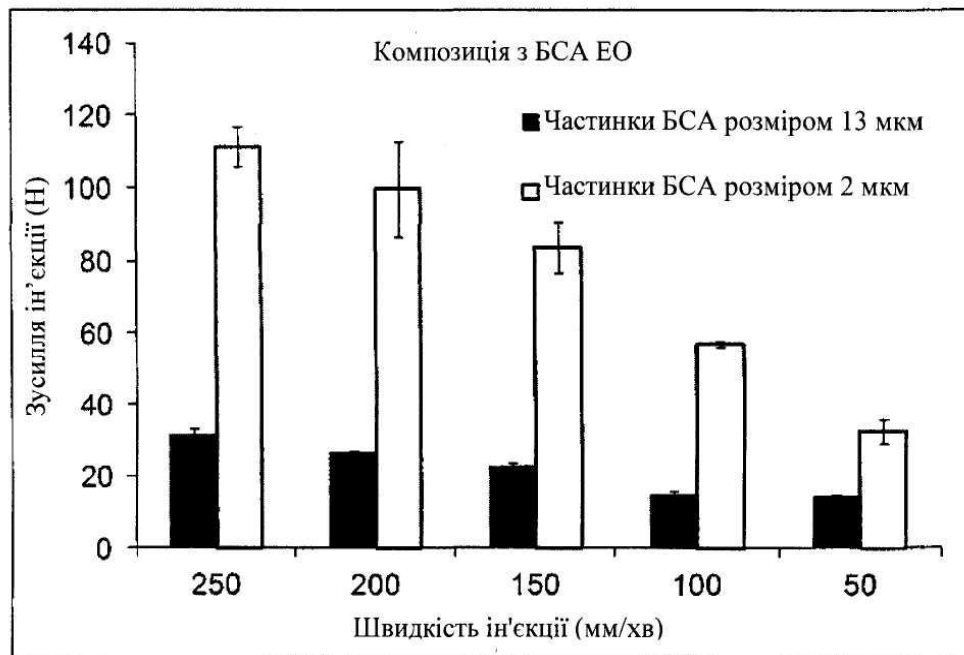
Фіг. 6А



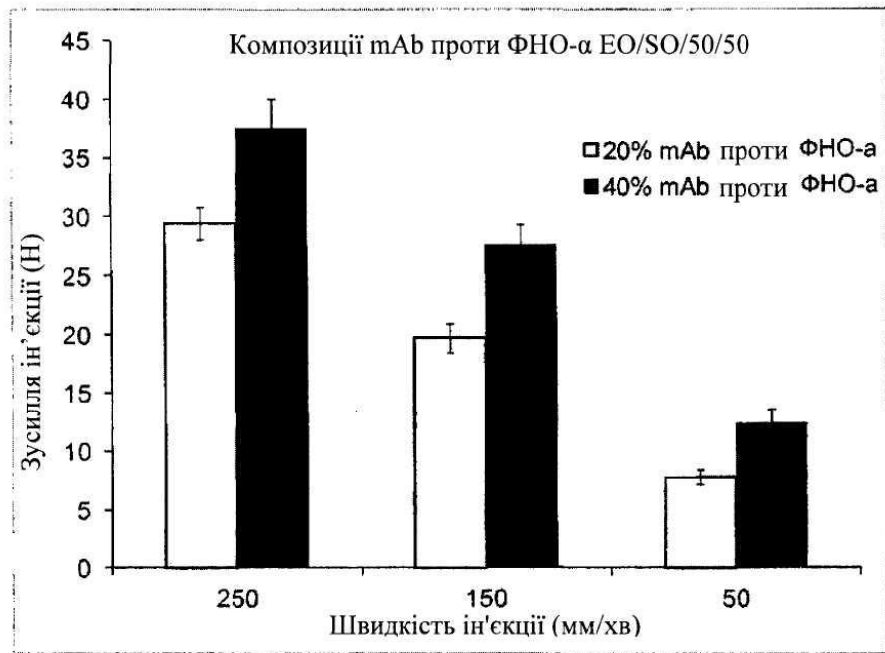
Фіг. 6В



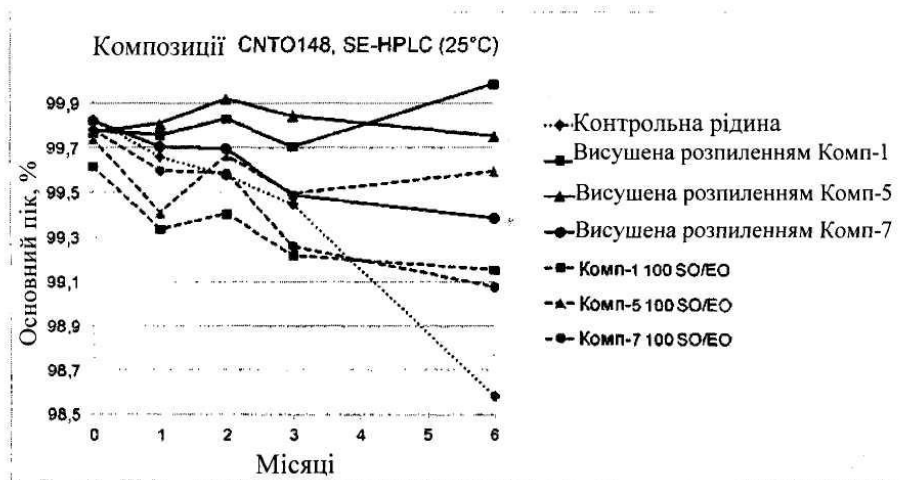
Фіг. 7А



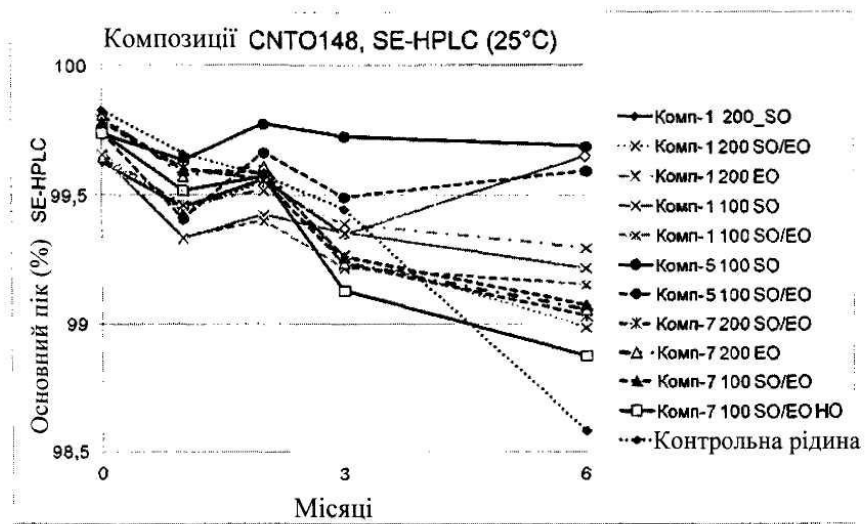
Фіг. 7В



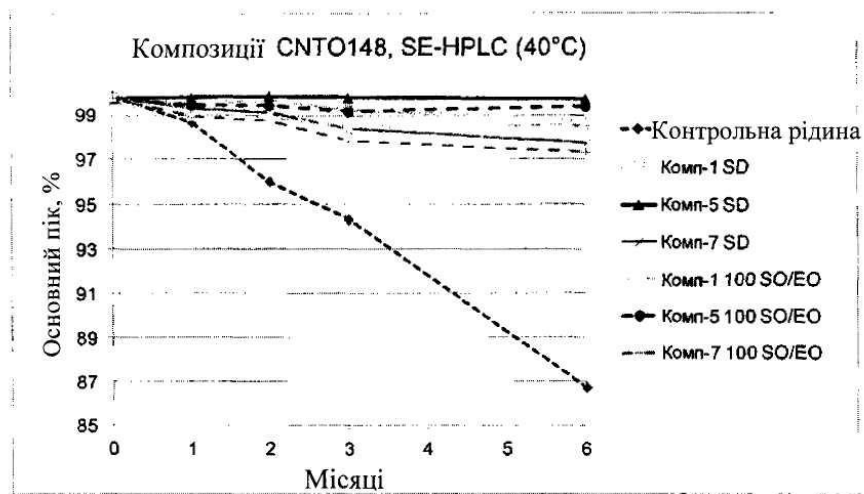
Фіг. 7С



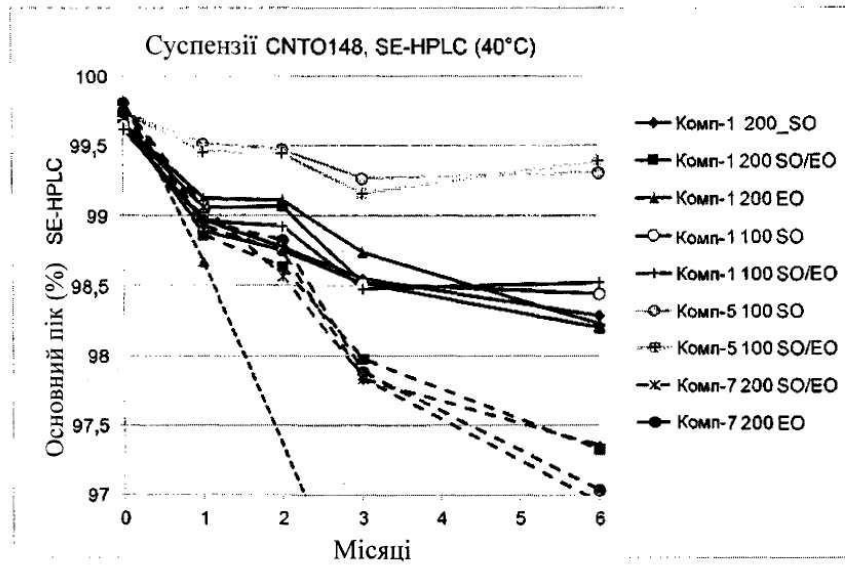
Фіг. 8А



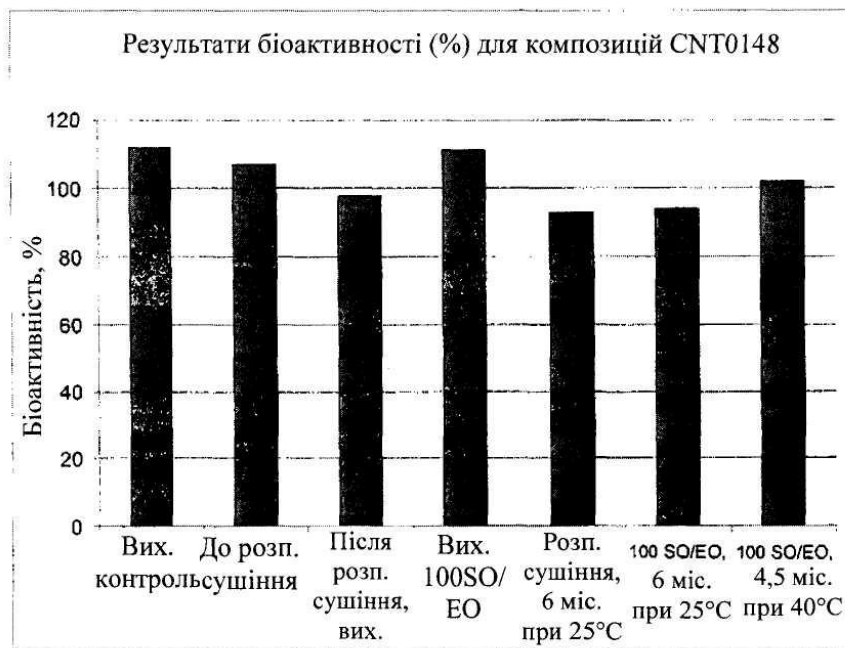
Фіг. 8В



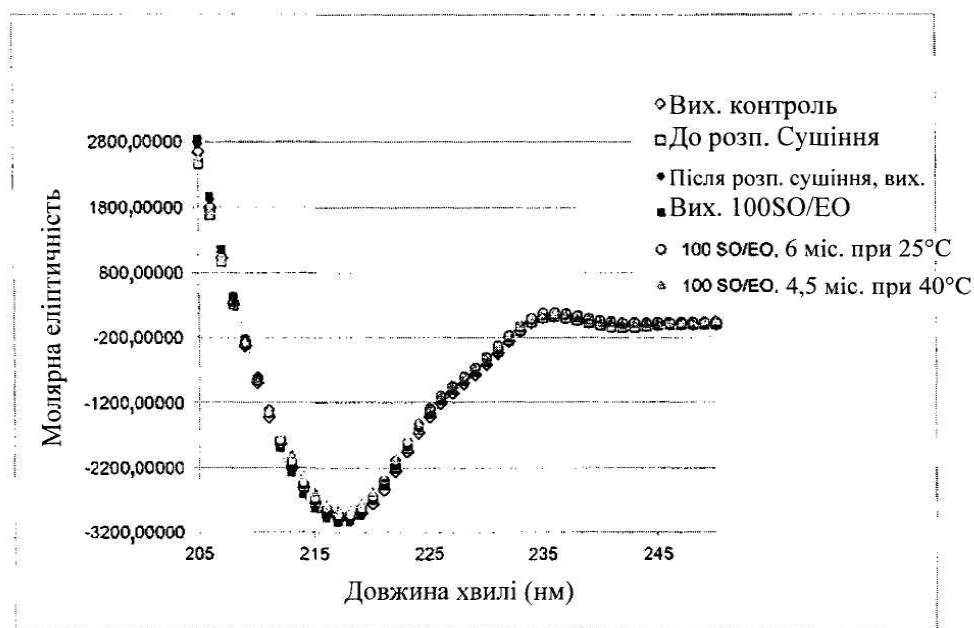
Фіг. 9А



Фіг. 9В



Фіг. 10



Фиг. 11

TVN14 (1) QVQLVSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAIILYDGSSKKY (60)
TVN15 QVQLVSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFILYDGSNKKY
TVN148 QVQLVSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWEWVAFMSYDGSNKKY
TVN148B QVQLVSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFIFSSYAMHWVRQAPGNGLWEWVAFMSYDGSNKKY
TVN196 QVQLVSGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKKK

TVN14 {61} ADSVKDRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDRGISAGGNYYYYGMDVWGQGT (120)
TVN15 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDRGVSAAGGNYYYYGMDVWGQGT
TVN148 ADSVKGRFTISRDN PKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDRGISAGGNYYYYGMDVWGQGT
TVN148B ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARDRGIAAGGNYYYYGMDVWGQGT
TVN196 ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSLRAEDTAVFYCARDRGIGAGGNYYYYGMDVWGQGT
*****-**-***-***-**-*-*****-*****-*****-*****-*****-*****

```

TVN14 (121)   TVTVSS                                     (126)
TVN15         TVTVSS
TVN148        TVTVSS
TVN148B       TVTVSS
TVN196        TVTVSS
*****

```

FIG. 12A

```

TNV14 (1) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA (60)
TNV15 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
TNV148 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
TNV148 (B) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
TNV196 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
*****

```

```

TNV14 (61) RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK (108)
TNV15 RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
TNV148 RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
TNV148 (B) RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
TNV196 RFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIK
*****

```

Fig. 12B

Комп'ютерна верстка О. Рябо

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601