



УКРАЇНА

(19) UA (11) 90460 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/32

A61K 47/30

A61K 47/02

A61K 47/06

A61K 39/395

A61K 9/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ПРЕПАРАТ, ЩО ВКЛЮЧАЄ АНТИТІЛО ПРОТИ РЕЦЕПТОРА EGF

1

(21) a200607106
(22) 26.10.2004
(24) 11.05.2010
(86) РСТ/ЕР2004/012044, 26.10.2004
(31) 103 55 251.0
(32) 26.11.2003
(33) DE
(46) 11.05.2010, Бюл.№ 9, 2010 р.
(72) МАЛЕР ХАННС-КРИСТІАН, DE/DE, МЮЛЛЕР РОБЕРТ, DE/DE
(73) МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ, DE
(56) DE10163459 A1, 03.07.03.
WO02072636 A, 19.09.02.
EP0852951 A, 15.07.98.
(57) 1. Водний препарат, що містить цетуксимаб або матузумаб, буфер, амінокислоту та поверхнево-активну речовину, за умови, що він не містить будь-якого цукру.
2. Препарат за п. 1, який відрізняється тим, що буфер містить одну або більше: сіль лимонної кислоти, сіль оцтової кислоти, гістидинову сіль, сукцинатну сіль, малатну сіль, фосфатну сіль або сіль молочної кислоти та/або їхні відповідні вільні кислоти або основи, або суміші однієї або більше різних солей та/або їхні кислоти та/або основи.
3. Препарат за п. 2, який відрізняється тим, що буфер містить одну або більше: сіль лимонної кислоти та/або її вільну кислоту, сіль оцтової кислоти та/або її вільну кислоту або L-гістидин та/або його сіль приєднання кислоти.
4. Препарат за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється тим, що амінокислотою є L-аргінін, гліцин або L-метіонін.
5. Препарат за будь-яким з пп. 1-4, який відрізняється тим, що поверхнево-активною речовиною є поліетиленовий ефір сорбіту та жирної кислоти або співполімер поліоксіетилен-поліоксипропілену.

2

6. Препарат за п. 5, який відрізняється тим, що поверхнево-активною речовиною на основі поліетиленового ефіру сорбіту та жирної кислоти є поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеат або поліоксіетилен(20)сорбітмонолаурат.
7. Препарат за п. 6, який відрізняється тим, що поверхнево-активною речовиною є Полосамер 407.
8. Препарат за будь-яким з пп. 1-7, який відрізняється тим, що він додатково містить модифікатор ізотонічності у концентрації, необхідній для модифікації ізотонічності.
9. Препарат за п. 8, який відрізняється тим, що модифікатором ізотонічності є хлорид натрію.
10. Препарат за будь-яким з пп. 1-9, який відрізняється тим, що він має значення рН 5-7, краще від рН 5,2 до рН 6,0.
11. Препарат за п. 10, який відрізняється тим, що він має значення рН приблизно 5,5.
12. Препарат за будь-яким з пп. 1-11, який відрізняється тим, що він містить приблизно 5 мг/мл цетуксимабу або матузумабу, приблизно 10 ммоль/л цитратного або гістидинового буфера, приблизно 100 ммоль/л гліцину, L-аргініну або L-метіоніну, приблизно 100 ммоль/л хлориду натрію і приблизно 0,01 % поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату та має значення рН приблизно 5,5.
13. Спосіб одержання фармацевтичного препарату за будь-яким з пп. 1-12, який відрізняється тим, що водний препарат, що містить анти-EGFR антитіло, додають до однієї із вказаних допоміжних речовин.
14. Застосування препарату за будь-яким з пп. 1-12 для лікування пухлинних захворювань.

(13) C2

(11) 90460

(19) UA

Даний винахід відноситься до фармацевтичного препарату, що включає антитіло, яке спрямовано проти рецептора епідермального фактора росту (EGFR), до його одержання і застосування.

Різнорізані дослідження *in vitro* і *in vivo* показали, що дія блокування EGFR за допомогою антитіла, спрямована проти пухлин на різних рівнях, наприклад, шляхом інгібування проліферації ракових кліток, зниження ангиогенезу, опосередкованого пухлиною, індукції апоптоза ракових кліток і підвищення токсичних ефектів радіотерапії і традиційної хіміотерапії.

MAB c225 (INN: цетуксимаб) являє собою клінічно схвалене антитіло, яке зв'язується з рецептором EGF. Цетуксимаб являє собою химерне антитіло, варіабельні ділянки якого мають походження від миші, а константні ділянки мають людське походження. Цетуксимаб уперше був описаний Naramura і ін., *Cancer Immunol. Immunotherapy* 1993, 37: 343-349 і у WO 96/40210 A1.

MAB 425 є вихідне мишаче антитіло, яке спрямоване проти EGFR, який надекспресується в пухлинних клітках, зокрема, у клітках карциноми A431. Його гуманізовані і химерні форми описані, наприклад, у EP 0 531 472 A1; Kettleborough і ін., *Protein Engineering* 1991, 4: 773-783; Bier і ін., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001, 47: 519-524; Bier і ін., *Cancer Immunol. Immunother.* 1998, 46: 167-173. EMD 72000 (h425) являє собою форму MAB 425, яка знаходиться в фазі клінічних іспитів I/II. Константна ділянка цього антитіла складається з k-ланцюга і людської γ -1 ланцюга.

Людські анти-EGFR антитіла можуть бути отримані за допомогою методики XenoMouse, як описано в WO 91/10741 A1, WO 94/02602 A1 і WO 96/33735 A1. Специфічні антитіла, які були отримані за допомогою цієї методики і в даний час піддаються клінічним іспитам, являють собою ABX-EGF (Abgenix, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001, 38: 17-23; *Cancer Research* 1999, 59: 1236-43).

Антитіла, спрямовані проти EGFR, описані також, наприклад, у EP 0 586 002 B1 і в *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85: 27-33 (MAB 528).

Подібно іншим антитілам, анти-EGFR антитіла також використовуються парентерально у вигляді розчину для терапевтичного застосування. Особлива проблема розчинів, що включають ці антитіла, полягає в їхній схильності до агрегації й утворення білкових мультимерів. У випадку відновлюваних мультимерів, це явище може пояснюватися утворенням випадкових внутрішньомолекулярних дисульфідних містків за допомогою взаємодії між залишками, що знаходяться поблизу один від одного. Гідрофобні взаємодії й утворення в результаті цього невідновлюваних мультимерів також є можливим. Крім того, також можуть відбуватися реакції дезамідування, що згодом приводять до реакцій розкладання білка. Описані реакції денатурації виникають, зокрема, при збереженні в умовах підвищеної температури або під час стресів зсуву, наприклад, при транспортуванні.

Як наслідок вказаної тенденції до агрегації, випадання продукту в осад відбувається при збереженні розчинів антитіла, означаючи при цьому,

що відтворене вилучення з контейнера, що містить розчин, є сумнівним. Крім того, при парентеральному введенні розчину, що містить частки, може виникнути емболія. Це приводить до того, що введення анти-EGFR антитіла пацієнту у необхідній у кожному випадку дозі не завжди можна гарантувати відтвореним чином при використанні розчину антитіла, і введення не може відбуватися з необхідною надійністю.

Незважаючи на те, що фільтрування перед здійсненням ін'єкції дозволяє усунути агрегати, цей спосіб, однак, включає додатковий етап і є, таким чином, складним і не дуже прийнятним для клінічної практики. На додаток до цього, проблема відтворення дози залишається невирішеною, оскільки в кожному випадку з розчину видаляється невідома фракція антитіла і утворення часток після фільтрації продовжує представляти ризик для безпеки.

Загальноприйнятий спосіб для стабілізації моноклональних антитіл являє собою сублімаційну сушку розчинів, що включають антитіла і допоміжні речовини. Однак ліофілізація вимагає значних витрат часу й енерговитрат і, тому, є дорогою. Крім того, ліофілізат повинний бути спочатку відновлений перед введенням.

EP 0 073 371 описує препарати для внутрішньовенного введення, що включають імуноглобуліни, зазначені препарати мають значення pH від 3,5 до 5,0 для стабілізації. Однак такі низькі значення pH приводять до небажаної несумісності реакцій у сайті ін'єкції.

US 6,171,586 B1 розкриває застосування ацетатного буфера зі значенням pH від 4,48 до 5,5, сурфактанта і поліолу у водяній композиції антитіла, що містить NaCl для виключення модифікації ізотонічності. Завдяки відсутності модифікації ізотонічності, несумісні реакції у сайту ін'єкції можуть також мати місце.

Як на приклади додаткових композицій, що включають специфічні антитіла, можна зробити посилання на EP 0 280 358, EP 0 170 983 і US 5,945,098.

При цьому EP 0 280 358 описує додавання декстрану до розчину антитіла для стабілізації проти дії певних гормонів, у цьому випадку досягали стабільності протягом 9 місяців.

EP 0 170 983 описує стабілізацію термолабільного моноклонального антитіла шляхом прогрівання разом з гідролізованим яєчним альбуміном, у результаті чого антитіло залишалось стабільним після збереження протягом 7 днів при 45°C. Однак додавання білків інших видів до композицій, призначених для парентерального введення, є небажаним із причин, асоційованих з цим, зокрема, через їх можливі антигенності.

US 5,945,098 розкриває застосування гліцину, полісорбату 80 і полі-етиленгліколю для стабілізації водяного розчину імуноглобуліну G.

DE 10133394 A1 розкриває застосування фосфатного буфера в інтервалі значень pH від 6 до 8 і естеру жирної кислоти поліоксетиленсорбіту для стабілізації водяного розчину антитіла цетуксимаба. Незважаючи на той факт, що це значно знижує

утворення видимих агрегатів, хімічна стабільність, зокрема, у стресових умовах, значно погіршується. Крім того, композиція не демонструє стабільності до (високо)температурного стресу, наприклад, тривалому збереженню при 40°C.

Задача даного винаходу полягає в тому, щоб відшукати водяну композицію, специфічне призначену для антитіл, спрямованих проти EGFR, яка є прийнятною для парентерального введення, добре переноситься і стабільна при збереженні при кімнатній температурі протягом, принаймні, 24 місяців. Стабільність при збереженні також повинна зберігатися у випадку впливу сил зсуву, які виникають при транспортуванні і при модифікованих кліматичних умовах, зокрема, при підвищеній температурі й атмосферній вологості. Крім того, композиція повинна мати простий склад і не включати яких-небудь допоміжних речовин, які є сумнівними з токсикологічної точки зору.

Несподівано було встановлено, що композиція, яка відповідає цим вимогам, знаходиться у формі розчину, який, в додаток до антитіла, спрямованому проти епідермального фактора росту (анти-EGFR антитіла), включає буфер, амінокислоту і сурфактант. Даний винахід, таким чином, відноситься до водяного фармацевтичного препарату, який, в додаток до анти-EGFR антитіла, включає буфер, амінокислоту і сурфактант.

Для цілей даного винаходу водяний препарат являє собою такий, у якому, принаймні, частина присутнього розчинника складається з води. Додаткові складові розчинника, які можуть бути присутніми, являють собою всі розчинники, які є прийнятними для парентерального застосування, зокрема, спирти, такі, як, наприклад, етанол, пропанол, пропандіол або гліцерин. Водяний препарат переважно включає у якості розчинника воду або суміші етанол/вода; розчинник, зокрема, переважно складається з води.

Присутнє антитіло може являти собою будь-які анти-EGFR антитіла, зокрема, мишачі, гуманізовані або химерні антитіла, згадані на початку, а також людські анти-EGFR антитіла, які були і можуть бути отримані за допомогою зазначеної методики XenoMouse. Перевага віддається анти-EGFR антитілу цетуксимабу або EMD 72000, або одному з мишачих, гуманізованих або химерних аналогів антитіла, що відповідає їм. Особлива перевага віддається водяним препаратам, які включають цетуксимаб або EMD 72000 як антитіло.

Анти-EGFR антитіло може бути присутнім у композиції відповідно до винаходу в концентрації від 0,1 мг/мл до 50 мг/мл, переважно від 2 мг/мл до 10 мг/мл, зокрема, переважно приблизно 5 мг/мл.

Буфери, які можуть використовуватися, в основному являють собою усі фізіологічно переносимі речовини, які є прийнятними для встановлення бажаного значення pH, такі, як, наприклад, цитратні солі, ацетатні солі, солі гістидину, сукцинатні солі, малатні солі, фосфатні солі або лактатні солі і/або їхні відповідні вільні кислоти або основи, а також суміші різних солей і/або їх кислот або основ. Буфер переважно складається з однієї або більш цитратної(их) солі(ей), ацетатної(их) солі(ей), солі(ей) гістидину, сукцинатної(их) солі(ей),

малатної(их) солі(ей), фосфатної(их) солі(ей) або лактатної(их) солі(ей) і/або їх відповідної(их) вільної(их) кислоти(кислот) або основи(основ), або суміші однієї або більш різних солей і/або їхньої кислоти(кислот) або основи(основ). У даному випадку термін «суміш» охоплює як суміші різних солей тієї ж кислоти, такі, як, наприклад, суміші різних цитратних солей, так і суміші солей різних кислот, таких, як, наприклад, суміші цитратних і ацетатних солей. Буфер переважно складається з однієї або більш цитратної(их) солі(ей) і/або її вільної кислоти (наприклад, лимонної кислоти, моногідрату лимонної кислоти, дигідрату цитрату тринатрію, моногідрату цитрату трикалію), ацетатної(их) солі(їй) і/або її вільної кислоти (наприклад, оцтової кислоти, ацетату натрію, тригідрату ацетату натрію) або L-гістидину і/або його солі приєднання кислоти, такої, як, наприклад, моногідрат моногідрохлориду L-гістидину. Препарат відповідно до винаходу переважно включає буфер у концентрації від 10 до 100 ммоль/л, переважно від 2 до 20 ммоль/л, особливо переважно приблизно 10 ммоль/л.

pH препарату знаходиться в інтервалі від 5,0 до 6,0, переважно від 5,2 до 5,8, особливо переважно приблизно 5,5.

Препарат відповідно до винаходу є фізіологічно добре переносимим, може бути легко отриманий, може бути точно відмірений і є стабільним у відношенні аналізу структури, продуктів розкладу й агрегатів протягом часу збереження, при процесах повторного заморожування і відтавання і механічного стресу. Він є стабільним при збереженні протягом періоду часу, принаймні, від 3 місяців до 4 років при температурі холодильника (2-8°C). Несподівано було виявлено, що препарат відповідно до винаходу є також стабільним при збереженні протягом періоду часу до двох років при підвищеній температурі і високих рівнях атмосферної вологості, наприклад, при 25°C і 60% відносної атмосферної вологості, або протягом періоду 3 місяців при температурі 40°C і 75% відносної атмосферної вологості.

Амінокислота, що присутня у препараті, може бути основною амінокислотою, такою, як, наприклад, аргінін, гістидин, орнітин, лізин, або нейтральною амінокислотою, такою, як, наприклад, гліцин, метіонін, ізолейцин, лейцин і аланін, або ароматичною амінокислотою, такою, як, наприклад, фенілаланін, або тирозин тритофан. Основні амінокислоти переважно використовуються у формі їх неорганічних солей (переважно у формі солей хлористоводневої кислоти, тобто у вигляді гідрохлоридів амінокислоти). Використовувана амінокислота переважно в кожному випадку являє собою L-форму. Амінокислота, що присутня у препараті, зокрема, переважно являє собою L-аргінін, або гліцин L-метіонін.

Препарат включає амінокислоту в концентрації від 2 до 200 ммоль/л, переважно від 50 до 150 ммоль/л, зокрема, переважно приблизно 100 ммоль/л.

Сурфактанти, які можуть використовуватися, являють собою всі сурфактанти, звичайно використовувані у фармацевтичних препаратах, перева-

жно естери жирної кислоти поліетиленсорбіту і сополімери поліоксіетилену-поліоксипропілену. Естери жирної кислоти поліетиленсорбіту є також добре відомими під торговими найменуванням Твін. Прийнятні естери жирної кислоти поліетиленсорбіту являють собою, зокрема, поліоксіетилен(20)сорбітмонолаурат, поліоксіетилен(20)сорбітмонопальмитат і поліоксіетилен(20)сорбітмоностеарат. Перевага віддається поліоксіетилен(20)сорбітмонолаурату і поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату, зокрема, перевага віддається поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату. Сополімери поліоксіетилену-поліоксипропілену також є відомими під торговим найменуванням Полоксамер. Особливо кращий сополімер поліоксіетилену-поліоксипропілену являє собою Полоксамер 407 (CAS 9003-11-6).

Сурфактанти можуть бути присутнім у композиції в концентрації від 0,001ваг.% до 1,0ваг.%. Якщо естери жирної кислоти поліоксіетиленсорбіту присутні в якості сурфактантів, то вони переважно присутні в кількості від 0,005 до 0,1ваг.%, зокрема, переважно в кількості приблизно 0,01ваг.%. Якщо присутні сополімери поліоксіетилену-поліоксипропілену, то вони переважно представлені в кількості від 0,01 до 0,5ваг.%, зокрема, переважно 0,1ваг.%.

Для того щоб підвищити переносимість при парентеральному введенні осмотичний тиск переважно знаходиться в ізотонічному інтервалі, тобто осмотичний тиск складає від приблизно 250 до 350осмолей/кг. Препарат також може вводиться безпосередньо внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, а також підшкірно істотно безболісно.

Відповідно до кращого втілення препарат відповідно до винаходу, таким чином, додатково включає модифікатор ізотонічності, переважно фізіологічно переносиму сіль, таку, як, наприклад, хлорид натрію або хлорид калію, або фізіологічно переносимий поліол, такий, як, наприклад, глюкоза або гліцерин, в концентрації, необхідній для модифікації ізотонічності. Таким чином, винахід також відноситься до водяного препарату, що включає анти-EGFR антитіло, буфер, амінокислоту, сурфактант і модифікатор ізотонічності в концентрації, необхідній для модифікації ізотонічності. Хлорид натрію, зокрема, переважно є присутнім як модифікатор ізотонічності.

Крім того, розчини відповідно до винаходу можуть додатково включати фізіологічно переносимі допоміжні речовини, такі, як, наприклад, антиоксиданти, такі, як аскорбінова кислота або глутатіон, консерванти, такі, як фенол, м-крезол, метил- або пропілпарабен, хлорбутанол, тіомерсал або хлорид бензалконія, поліетиленгліколю (ПЕГ), такі, як ПЕГ 400, ПЕГ 3000, 3350, 4000 або 6000, дисахариди, такі, як трегалоза або сахароза, або циклодекстрини, такі, як гідроксипропіл-β-циклодекстрин, сульфобутилетил-β-циклодекстрин, α-циклодекстрин або γ-циклодекстрин.

Відповідно до особливо кращого втілення даного винаходу водяний препарат включає приблизно 5мг/мл цетуксимаба або EMD 72000, приблизно

но 10ммоль/л цитратного або гістидинового буфера, що має значення рН приблизно 5,5, приблизно 100ммоль/л гліцину, аргініну або L-метіоніну, приблизно 100ммоль/л хлориду натрію і приблизно 0,01% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату.

Водяний препарат може бути отриманий шляхом додавання вказаних допоміжних агентів до розчину, що включає анти-EGFR антитіло. З цією метою визначені обсяги маточних розчинів, які включають зазначені додаткові допоміжні речовини, у визначених концентраціях переважно додають до розчину, який має визначену концентрацію анти-EGFR антитіла, яке отримано зі свого препарату. Цю суміш, якщо це є бажаним, розводять до попередньо розрахованої концентрації водою або буферним розчином. Альтернативно, допоміжні речовини можна також додавати як тверді ліофілізату, то препарат відповідно до винаходу може бути отриманий шляхом початкового розчинення відповідних антитіл у воді або водяному розчині, що включає одну або більше допоміжних речовин, і наступного додавання необхідних у кожному випадку кількостей маточних розчинів, що включають додаткові допоміжні речовини, а також додаткових допоміжних речовин у твердій формі і/або води. Анти-EGFR антитіло може також переважно безпосередньо розчинятися в розчині, що включає всі додаткові допоміжні речовини.

Одна або більше допоміжних речовин, що присутні в препараті відповідно до винаходу, можуть переважно вже бути доданими під час або наприкінці процесу одержання визначеного антитіла EGFR. Це переважно можна здійснювати шляхом розчинення анти-EGFR антитіла безпосередньо у водяному розчині, що включає одну, більш, ніж одну, або всі додаткові допоміжні речовини, на заключному етапі очищення, здійснюваному після його одержання. Для того, щоб одержати препарат, відповідний(і) додатковий(і) інгредієнт(и) потім тільки необхідно додати в меншій кількості в кожному випадку і/або не додавати взагалі. Особливо переважним для відповідного інгредієнта є те, щоб його розчиняли безпосередньо у водяному розчині, що включає всі додаткові допоміжні речовини на заключному етапі очищення, який здійснюють після його приготування.

Якщо розчин, що включає відповідне антитіло і допоміжні речовини, ще не має бажаного значення рН, то його встановлюють шляхом додавання кислоти або основи, переважно використовуючи кислоту або основу, що вже містяться в буферній системі. Після цього здійснюють стерильну фільтрацію.

Водяний препарат відповідно до винаходу може переважно використовуватися для лікування пухлинних захворювань.

Представлені приклади пояснюють даний винахід, не обмежуючи його.

Приклад 1 (Приклад порівняння 1)

Водяний розчин, що включає:

2мг/мл цетуксимаба

10ммоль/л натрій фосфатного буфера рН 7,2

145ммоль/л хлориду натрію

Приготування здійснювали шляхом змішування визначених об'ємів водяних розчинів, що містять відповідні допоміжні речовини, в визначеній концентрації. Використовували наступні розчини:

Розчин А (розчин активного інгредієнта), що містить:

18мг/мл цетуксимаба

10ммоль/л натрій фосфатного буфера рН 7,2

(що складається з 2,07г/л 7-гідрату гідрофосфату динатрію і 0,31г/л моногідрату дигідрофосфату натрію)

145ммоль/л хлориду натрію

(Розчин одержували шляхом повторної буферизації активного інгредієнта проти розчину В за допомогою тангенціальної проточної фільтрації на заключному етапі очищення активного інгредієнта, яке відбувається після його приготування).

Розчин В (розчин буфер/сіль)

Відповідає розчину А, але не включає активно-го інгредієнта.

Для одержання розчину порівняння 1 1,11 об'ємних частин розчину А і 8,89 об'ємних частин розчину В з'єднували один з одним.

Приготовлений розчин перед перенесенням у флакони фільтрували при використанні стерильного фільтра і переносили у флакони для ін'єкцій. Флакони для ін'єкцій закривали пробками й обжимали краї.

Приклад 2 (Приклад порівняння 2)

Водяний розчин, що включає:

2мг/мл цетуксимаба

10ммоль/л натрій фосфатного буфера рН 7,2

145ммоль/л хлориду натрію

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

Приготування здійснювали шляхом змішування визначених об'ємів водяних розчинів, що включають відповідні інгредієнти, у визначених концентраціях. Крім розчину А, використовували наступний розчин.

Розчин С (розчин буфер/сіль, що включає поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеат)

Відповідає розчину В, але додатково включає

0,0125ваг.% поліоксіети-

лен(20)сорбітмоноолеату.

Для одержання розчину порівняння 2 1,11 об'ємних частин розчину А і 8,89 об'ємних частин розчину С з'єднували один з одним.

Приготовлений розчин перед перенесенням у флакони фільтрували при використанні стерильного фільтра і переносили у флакони для ін'єкцій. Флакони для ін'єкцій закривали пробками й обжимали краї.

Приклад 3 (композиція відповідно до винаходу)

5мг/мл цетуксимаба

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

100ммоль/л гліцину

100ммоль/гмспориду натрію

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

Приготування здійснювали шляхом змішування визначених об'ємів водяних розчинів, що включають відповідні інгредієнти, у визначених концентраціях.

Розчин D (розчин активного інгредієнта в цитратному буфері)

16мг/мл цетуксимаба

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти)

(Розчин одержували шляхом повторної буферизації активного інгредієнта проти розчину Е за допомогою тангенціальної проточної фільтрації на заключному етапі очищення активного інгредієнта, що відбувається після його приготування).

Розчин Е (буферний розчин):

Відповідає розчину D, але не містить активно-го інгредієнта.

Розчин F (розчин буфер/сіль):

Відповідає розчину Е, але включає

145,5ммоль/л гліцину,

145,5ммоль/л хлориду натрію і

0,015ваг.%

поліоксіети-

лен(20)сорбітмоноолеату.

Для одержання композиції відповідно до винаходу 3,125 об'ємних частин розчину D і 6,875 об'ємних частин розчину F з'єднували один з одним.

Приготовлений розчин перед перенесенням у флакони фільтрували при використанні стерильного фільтра і переносили у флакони для ін'єкцій. Флакони для ін'єкцій закривали пробками й обжимали краї.

Приклад 4

Наступні розчини одержували аналогічно до способів, описаних вище прикладів:

Приклад 4.1, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,9410г/л дигідрата цитрату тринатрія).

Приклад 4.2, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

100ммоль/л хлориду натрію

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти)

Приклад 4.3, розчин, що включає:

5мг/мл EMD 72000

100ммоль/л гліцину

100ммоль/л хлориду натрію

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти).

Приклад 4.4, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л L-метіоніну

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти).

Приклад 4.5, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л ацетатного буфера рН 5,5
(що складається з 1,3608г/л тригідрату ацетату натрію).

Приклад 4.6, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

0,01ваг.% поліоксіетилен(20)сорбітмоноолеату

10ммоль/л гістидинового буфера рН 5,5

(що складається з 2,069г/л моногідрату моногідрохлориду L-гістидину).

Приклад 4.7, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

0,01ваг.%

поліоксіети-

лен(20)сорбітмонолаурату

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти).

Приклад 4.8, розчин, що включає:

5мг/мл цетуксимаба

100ммоль/л гліцину

0,1ваг.% сополімера 407 поліоксіетилену-поліоксипропілену

(Полоксамер 407)

10ммоль/л цитратного буфера рН 5,5

(що складається з 2,1014г/л моногідрату лимонної кислоти).

Приклад 5

Стабільність композиції відповідно до винаходу аналізували в аналізі на стрес. З цією метою флакони, що містять розчин відповідно до Прикладів 1 і 2, зберігали при температурі 25°C і 60%-ний відносної атмосферної вологості, а також при 40°C і 75%-ний відносної атмосферної вологості. На додаток флакони, що містять розчини відповідно до Прикладів 1, 2 і 3, струшували протягом п'яти днів в апараті для струшування при частоті 150хв⁻¹ при кімнатній температурі і тричі заморожували при -20°C і послідовно знову відтаювали при +5°C. Перед збереженням і через визначені проміжки часу збереження флакони аналізували візуально при використанні прямого освітлення за допомогою джерела люмінесцентного світла і визначали абсорбцію розчинів при 350нм, що являє собою міру мутності. Для того щоб проілюструвати вплив збереження або обробки, відносну мутність у кожному випадку підраховували відносно вихідного значення. Крім того, флакони аналізували за допомогою гель-фільтраційної рідинної хроматографії високого розділення у відношенні вмісту цетуксимаба, агрегатів і продуктів розпаду.

Результати представлені в Таблиці 1.

Таблиця 1

Досліджуваний розчин	Збереження [час/умови]	Цетуксимаб [%]	Агрегати [%]	Продукти розпаду [%]	Мутність при λ=350нм	Відносна мутність при λ=350нм	Візуальна оцінка
Приклад 1	0 тижнів	99,67	0,12	0,22	0,005	1,00	Дрібні частки, невелика кількість, прозорий
Приклад 1	8 тижнів 25°C/60% відн. вол.	98,99	0,28	0,73	0,0081	1,62	Великі частки, велика кількість, прозорий
Приклад 1	8 тижнів 40°C/75% відн. вол.	95,08	3,23	1,69	0,0235	4,70	Великі частки, велика кількість, прозорий
Приклад 1	Струшування протягом 5 днів при 150об./хв. і відн. вол.	99,60	0,17	0,24	0,829	165,80	Дуже великі частки, дуже велика кількість, мутний
Приклад 1	3 цикли заморожування/відтаювання при -20°C і +5°C	99,68	0,14	0,18	0,0089	1,78	Великі частки, високий вміст часток, прозорий

Приклад 2	0 тижнів	99,62	0,18	0,21	0,0048	1,00	Частки відсутні, прозорий
Приклад 2	8 тижнів 25°C/60% відн. вол.	99,02	0,28	0,70	0,0071	1,48	Дрібні частки, невелика кількість, прозорий
Приклад 2	8 тижнів 40°C/75% відн. вол.	93,95	4,34	1,72	0,0241	5,02	Дрібні частки, невелика кількість, прозорий
Приклад 2	Струшування на прот. 5 днів при 150об./мін. і відн. вол.	99,51	0,26	0,23	0,0075	1,56	Відсутність часток, прозорий
Приклад 2	3 цикли заморожування/відтаювання при -20°C і +5°C	99,61	0,21	0,18	0,0064	1,48	Відсутність часток, прозорий

Приклад 3	0 тижнів	99,72	0,15	0,14	0,018	1,00	Відсутність часток, прозорий
Приклад 3	8 тижнів 25°C/60% відн. вол	99,38	0,18	0,44	0,020	1,08	Дрібні частки, невелика кількість, прозорий
Приклад 3	8 тижнів 40°C/75% відн. вол.	98,15	0,46	1,40	0,030	1,63	Дрібні частки, невелика кількість, прозорий
Приклад 3	Струшування на прот. 5 днів при 150об./мін. і від. вол.	99,15	0,70	0,15	0,019	1,04	Відсутність часток, прозорий
Приклад 3	3 цикли заморожування/відтавання при -20°C і +5°C	99,75	0,14	0,12	0,018	1,00	Відсутність часток, прозорий

Таблиця 1: Підсумкові дані у відношенні стабільності композиції відповідно до винаходу (Приклад 3) і двох розчинів порівняння (Приклади 1 і 2).

Результати ясно показують, що композиція відповідно до винаходу має значно велику стабільність у порівнянні з розчинами порівняння, відомими з рівня техніки.