



(51) МПК
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013141548/15, 09.02.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 09.02.2012

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 11.02.2011 SE 1150109-5

(43) Дата публикации заявки: 20.03.2015 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 20.10.2016 Бюл. № 29

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: KRISTIN HAUFF et al., Peptide-based approaches to treat asthma, arthritis, other autoimmune diseases and pathologies of the central nervous system. Arch Immunol Ther Exp, 2005, 53,308-320. WO2009015345 A1, 29.01.2009. WO9406457 A1, 31.03.1994.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 11.09.2013

(86) Заявка РСТ:
 SE 2012/050124 (09.02.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2012/108828 (16.08.2012)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ФРАНССОН Йонас (SE),
 ФЛОРИН-РОБЕРТССОН Эбба (SE)**

(73) Патентообладатель(и):

**СВЕДИШ ОРФАН БИОВИТРУМ АБ
 (ПАБЛ) (SE)**

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ БЕЗ ЦИТРАТА, СОДЕРЖАЩИЕ АНАКИНРУ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, приемлемой для инъекции, содержащей анакинру в качестве активного соединения, а также ЭДТУ, Полисорбат-80, хлористый натрий, фосфат натрия, рН 6-7, маннит, в отсутствие цитрата.

Изобретение обеспечивает полезность для лечения опосредуемых IL-1 расстройств, стабильность и уменьшение боли в месте подкожной инъекции во время указанного лечения. 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 7 табл., 10 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)*A61K 47/10* (2006.01)*A61P 19/02* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013141548/15, 09.02.2012**(24) Effective date for property rights:
09.02.2012

Priority:

(30) Convention priority:
11.02.2011 SE 1150109-5(43) Application published: **20.03.2015** Bull. № 8(45) Date of publication: **20.10.2016** Bull. № 29(85) Commencement of national phase: **11.09.2013**(86) PCT application:
SE 2012/050124 (09.02.2012)(87) PCT publication:
WO 2012/108828 (16.08.2012)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**FRANSSON Jonas (SE),
FLORIN-ROBERTSSON Ebba (SE)**

(73) Proprietor(s):

**SVEDISH ORFAN BIOVITRUM AB (PABL)
(SE)****(54) CITRATE FREE PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING ANAKINRA**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: present invention relates to pharmaceutical compositions, suitable for injection, comprising anakinra as an active compound, as well as EDTA, polysorbate 80, sodium chloride, sodium phosphate, pH 6-7, mannitol, in the absence of sodium

citrate.

EFFECT: invention provides usefulness for the treatment of IL-1 mediated disorders, stability and decreasing nociceptive pain during such treatment.

1 cl, 4 dwg, 7 tbl, 10 ex

C 2
8 4 8 6 5 2
R UR U
2 5 9 9 8 4 8
C 2

Область техники

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим анакинру в качестве активного соединения в отсутствие цитрата натрия. Указанные фармацевтические композиции полезны для лечения опосредуемых IL-1 расстройств и для уменьшения ноницептивной боли во время такого лечения.

Уровень техники

Фармацевтические композиции, приемлемые для парентеральной доставки, как правило, содержат (a) активную молекулу; (b) буферный агент с подходящей буферной способностью для регулирования pH раствора; и (c) регулирующее тоничность вещество, чтобы обеспечить изотоничность композиции. Кроме того, могут быть добавлены дополнительные компоненты, такие как антиоксиданты, специфические стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, консерванты и т.д., которые необходимы в зависимости от специфической активности и предполагаемого применения.

Выбор компонентов композиции должен базироваться на тщательных исследованиях, оценивающих различные компоненты с точки зрения их функции в композиции и оптимальной стабилизирующей способности. Кроме того, должны быть проведены другие исследования состава для определения других параметров раствора, таких как оптимальное значение pH и ионная сила для конкретной активной молекулы и ее предполагаемого применения. Также проводят исследования с целью оптимизации концентраций соответствующих компонентов композиции. Во многих случаях должны быть рассмотрены дополнительные аспекты конечной композиции и ее клинического применения, такие как объем инъекции, совместимость с физиологическими жидкостями или тканями, вязкость, местная переносимость и т.д.

Один из примеров местной переносимости относится к выбору типа буфера. Известно, что определенные типы буфера могут провоцировать местную непереносимость или боль при инъекции. Цитрат натрия, как сообщалось, в некоторых случаях вызывает боль при подкожной инъекции (Frenken, 1993, Laursen, 2006). Кроме того, концентрация буфера должна быть минимизирована, чтобы быть оптимальной не только с точки зрения стабильности значения pH в составе лекарства во время продолжительного хранения, но и как оказывающая минимальное воздействие на физиологические состояния в месте инъекции (например, Fransson, Espander-Jansson, 1996).

Перечень компонентов, которые могут быть добавлены в композицию для парентеральной доставки, ограничен (Wang & Kowall, 1980; Nema, 2006). Должен быть учтен ряд аспектов: безопасность, до проведения опытов на человеке, доступность от поставщиков и т.д. Стабильность белковых лекарств *in vivo* и *in vitro* является сложной проблемой, где параллельно протекает множество реакций разложения, таких как окисление, деаминирование, агрегация и др. Одной из главных имеющих место реакций является образование агрегатов. Белковые агрегаты могут образовываться через ковалентные или не ковалентные пути и могут быть растворимыми или нерастворимыми по природе. Присутствие белковых агрегатов является большим поводом для беспокойства за перспективы безопасности, так как это может оказывать воздействие на вторичную и третичную структуры белка. Присутствие специфических ненативных белковых структур связывают с повышенной иммуногенностью белков, потенциально приводящей к пониженной эффективности или даже к *in vivo* иммунологическим реакциям с нативными белками, с состояниями, угрожающими в результате жизни.

Опосредуемые интерлейкином-1 заболевания включают ревматоидный артрит (РА, RA), воспалительное заболевание кишечника (ВЗК, IBD), сепсис, септический синдром, остеопороз, ишемическое повреждение, болезнь «трансплантат против хозяина»,

реперфузионное повреждение, астму, инсулинозависимый сахарный диабет, миелогенную и другие лейкемии, псориаз и кахексию. Такие и другие воспалительные заболевания характеризуются продуцированием цитокинов, включая интерлейкин-1.

Для таких синдромов, где роль для IL-1 в патологии заболевания была показана, клинические проявления заболевания могут быть легко ослаблены с помощью лечения анти-IL-1 медикаментов. Одним из таких медикаментов является Kineret[®], чей активный компонент, анакинра, представляет собой рекомбинантную разновидность существующего в природе антагониста рецептора IL-1 (IL-1ra). Анакинра раскрыта, например, в патенте США № 5075222.

Kineret[®] (анакинра для инъекции) составляют при концентрации 150 мг/мл с помощью 10 мМ буфера цитрата натрия (рН 6-7) и хлорида натрия (140 мМ) в качестве регулирующего тоничность вещества. Кроме того, используют 0,5 мМ ЭДТУ и 0,1% (масс./масс.) Полисорбата 80 в качестве стабилизаторов. Выбор цитрата натрия в качестве буферного компонента для анакинры основан на детальных исследованиях, оценивающих долговременную стабильность анакинры в реальных временных условиях. Были оценены некоторые потенциальные буферные компоненты, причем фосфат натрия был одним из них, и цитрат натрия был идентифицирован как обеспечивающий оптимальную стабильность относительно агрегации анакинры (Raibekas et al., 2005). Агрегация анакинры является главной проблемой выбора буферного компонента. Концентрация цитрата натрия была минимизирована настолько, насколько это возможно, учитывая местную переносимость.

При клиническом применении анакинры в 10 мМ цитрате натрия установлено, что препарат вызывает проблемы с местной переносимостью в месте подкожной инъекции (Thaler, 2009). Реакции на месте инъекции не являются необычными при подкожной доставке белковых лекарств и составляют общую проблему (Haller, 2008) и сопутствуют клиническому применению большого числа белковых лекарств. Более 50% пациентов, использующих анакинру для инъекции, в определенной степени испытывают реакции на месте инъекции в случае первых инъекций. Природа и механизм местной реакции изучен и сделано несколько заключений (Bendele, 1995). Сделан вывод, что реакция на месте инъекции имеет множество причин, включая саму молекулу анакинры и компоненты композиции, причем большое воздействие оказывает цитрат натрия.

Следовательно, существует потребность в композициях анакинры, приемлемых для инъекции, которые являются стабильными и которые исключают недостатки композиций анакинры, содержащих цитрат натрия.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает число частиц, невидимых невооруженным глазом (размерами больше чем 5, 7,5 и 10 мкм) на мл различных композиций анакинры (обозначенных E, G, H, O, R, S, T и U).

Фиг. 2 показывает число частиц, как на Фиг. 1, после хранения указанных композиций анакинры в течение 1 месяца при +25°C.

Фиг. 3 показывает число частиц, как на Фиг. 1, после хранения указанных композиций анакинры в течение 3 месяцев при +5°C.

Фиг. 4 показывает воспаление, которое определяют по увеличенному объему лапы, у самцов крыс Sprague-Dawley после введения различных композиций анакинры.

Описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением неожиданно было показано, что анакинра, приемлемая для инъекции, может быть достаточно стабилизирована без использования цитрата натрия. В отличие от сведений Raibekas et al. (2005) анакинра может быть

составлена в композицию в водном растворе с подходящим регулирующим тоничность веществом и дополнительными стабилизаторами, но без цитрата натрия в качестве буфера. При подходящих условиях получения анакинра будет по своей природе контролировать значение рН раствора. Даже раствор без добавления буфера может
5 быть достаточно стабильным.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество анакинры, где указанная фармацевтическая композиция не содержит цитрата натрия.

Другой аспект настоящего изобретения составляет способ лечения или
10 предупреждения опосредуемого IL-1 расстройства, который включает введение млекопитающему, включая человека, нуждающемуся в таком лечении, фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество анакинры, где указанная фармацевтическая композиция не содержит цитрат.

В соответствии с изобретением указанная композиция стабильна в отсутствие цитрата,
15 где определение «стабильна» подразумевает, что отсутствие агрегации и/или стабильность рН являются, по меньшей мере, одинаковыми с аналогичной композицией анакинры, содержащей 10 мМ цитрата натрия (рН 6-7).

Определение «анакинра» означает, в частности, антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra), содержащий последовательность из 152 аминокислот, показанную как положения 26-
20 177 в публикации «NCBI Reference Sequence NP_776214.1» (www.ncbi.nlm.nih.gov). Кроме того, определение «анакинра» следует понимать, как указывающее на модифицированные формы анакинры, например аминокислотные разновидности, имеющие, по меньшей мере, 90%, 95%, 97% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью анакинры. Специалисту в данной области техники будет понятно,
25 что большое число комбинаций делеций, вставок, инверсий и замещений может быть выполнено в пределах аминокислотной последовательности анакинры, при условии, что получаемая молекула («разновидность анакинры») является биологически активной, то есть обладает способностью ингибировать IL-1. Конкретные разновидности анакинры описаны в патентах США №№ 5075222, 6858409 и 6599873.

Определение «анакинра» дополнительно включает слитые белки, содержащие
30 анакинру. Анакинра может быть оформлена так, чтобы она имела большой гидродинамический размер, например, за счет присоединения полиалкиленгликолевой группы (например, полиэтиленгликолевой (ПЭГ, PEG) группы), сывороточного альбумина, трансферрина, трансферринового рецептора или, по меньшей мере, его
35 трансферрин-связывающей части, Fc-области антитела, или путем конъюгации к домену антитела.

Определение «эффективное количество» относится к количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект на подвергающемся лечению субъекте. Терапевтический эффект может быть объективным (то есть измеряемым с помощью
40 определенного теста или маркера) или субъективным (то есть субъект дает определение эффекту или ощущает эффект).

Предпочтительно анакинру вводят в дозе от 0,1 до 100 мг/кг в день, предпочтительно от 0,1 до 1 мг/кг в день. Предпочтительная доза для лечения опосредуемых IL-1 заболевания должна давать концентрации анакинры в крови от 1 до 1000 нг/мл.
45 Соответственно, предпочтительно, чтобы изначально вводились дозы с получением уровней циркулирующей в крови анакинры свыше 5 нг на мл плазмы.

Фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением предпочтительно содержит анакинру в количестве от 20 до 200 мг/мл, более предпочтительно от 100 до

200 мг/мл, например 150 мг/мл.

Фармацевтическую композицию в соответствии с изобретением предпочтительно адаптируют для подкожной инъекции анакинры. Предпочтительно фармацевтическая композиция содержит хелатообразователь, такой как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ, EDTA). Количество ЭДТУ в композиции предпочтительно составляет от 0,05 до 1 мМ, предпочтительно около 0,5 мМ. Эмульгатор, предпочтительно неионное поверхностно-активное вещество, такое как Полисорбат 80 (также известное как моноолеат полиоксиэтиленсорбитана или Tween 80TM), может быть добавлен в композицию для уменьшения агрегации и денатурации, а также для повышения растворимости. Количество Полисорбата 80 предпочтительно составляет от 0,01 до 1%, более предпочтительно около 0,1%. Следовательно, предпочтительная форма фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением содержит 150 мг/мл анакинры, 0,5 мМ ЭДТУ и 0,1% Полисорбата 80.

Кроме того, фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать регулирующее тоничность вещество, например NaCl, в количестве, достаточном, чтобы обеспечить изотоничность композиции. Предпочтительным регулирующим тоничность веществом является NaCl в концентрации от 120 до 240 мМ, предпочтительно приблизительно 120-180 мМ, например приблизительно 120-150 мМ, или наиболее предпочтительно около 140 мМ.

С другой стороны, указанное регулирующее тоничность вещество может представлять собой смесь NaCl и второго регулирующего тоничность вещества, выбранного из группы, включающей моносахариды, дисахариды и сахароспирты. Предпочтительно второе регулирующее тоничность вещество выбирают из группы, включающей сахарозу, маннит, сорбит, глицерин, инозитол и трегалозу. Более предпочтительно вторым регулирующим тоничность веществом является маннит, сорбит или глицерин. Более предпочтительно вторым регулирующим тоничность веществом является маннит в количестве от 1 до 100 мг/мл, предпочтительно от 5 до 50 мг/мл.

Изобретение включает фармацевтические композиции, где активный белок, например анакинра, является удовлетворительным в качестве буферного вещества и способным поддерживать значение pH на желаемом уровне, предпочтительно приблизительно при pH 6,5. Следовательно, никакого дополнительного буферного вещества не должно быть добавлено в композицию в соответствии с изобретением. Однако в изобретение также входят фармацевтические композиции, содержащие анакинру и, по меньшей мере, одно дополнительное буферное вещество, при условии, что указанное дополнительное буферное вещество не является цитратным буфером. Указанное дополнительное буферное вещество, например, может представлять собой фосфатный буфер или гистидин. Более конкретно, указанным дополнительным буфером мог бы быть фосфат натрия в количестве от 1 до 50 мМ, предпочтительно около 10 мМ, или гистидин в количестве от 5 до 50 мМ, предпочтительно около 10 мМ.

Особенно предпочтительными композициями являются композиции, содержащие фосфатный буфер в комбинации с маннитом. В таких композициях концентрация фосфата, такого как фосфат натрия, предпочтительно составляет от 1 до 50 мМ (более предпочтительно около 10 мМ), и концентрация маннита предпочтительно составляет от 5 до 50 мг/мл (более предпочтительно около 10 мг/мл). Значение pH указанной композиции предпочтительно составляет от 6 до 7, например от 6,3 до 6,6, или более предпочтительно около 6,5.

Следовательно, предпочтительные композиции в соответствии с настоящим изобретением включают композиции, содержащие:

- (a) анакинра (100-200 мг/мл);
- (b) ЭДТУ (0,05-1 мМ);
- (c) Полисорбат 80 (0,01-1%);
- (d) NaCl (120-180 мМ);
- 5 (e) фосфат натрия, рН 6-7 (1-50 мМ) и
- (d) маннит (5-50 мг/мл).

Особенно предпочтительная композиция содержит:

- (a) анакинра (150 мг/мл);
- (b) ЭДТУ (0,5 мМ);
- 10 (c) Полисорбат 80 (0,1%);
- (d) NaCl (120-150 мМ, предпочтительно 140 мМ);
- (e) фосфат натрия, рН 6,3-6,6, предпочтительно 6,5 (10 мМ) и
- (d) маннит (10 мг/мл).

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением

15 предпочтительно может быть использована при лечении, по меньшей мере, одного опосредуемого IL-1 расстройства. Также в настоящее изобретение включен способ лечения опосредуемого IL-1 расстройства, включающий введение млекопитающему, в том числе человеку, нуждающемуся в таком лечении фармацевтической композиции, описанной в изобретении. Определение «лечение» включает предупреждение

20 (профилактику) опосредуемых IL-1 расстройств, или ослабление симптомов, или устранение расстройства после того, как оно было выявлено.

Заболевание или медицинское состояние, как считают, является «опосредуемым IL-1 расстройством», если спонтанное или экспериментальное заболевание или медицинское состояние ассоциируется с повышенными уровнями IL-1 в жидкостях тела или тканях,

25 или если клетки или ткани тела продуцируют повышенные уровни IL-1 в культуре. Во многих случаях такие опосредуемые интерлейкином-1 заболевания также распознают с помощью следующих двух дополнительных условий: (1) патологические показатели, связанные с заболеванием или медицинским состоянием, могут быть имитированы экспериментально у животных путем введения IL-1; и (2) патология, вызванная в

30 экспериментальных животных моделях заболевания или медицинского состояния, может быть ингибирована или устранена путем лечения с помощью агентов, которые ингибируют действие IL-1. В большинстве опосредуемых IL-1 заболеваний, по меньшей мере, два из трех условий выполняются, и во многих опосредуемых IL-1 заболеваниях выполняются все три условия.

35 К опосредуемым IL-1 расстройствам относятся:

- Амилоидная А дистрофия
- Болезнь Стилла у взрослых (AOSD)
- Астма
- Болезнь Бехчета
- 40 - Синдром Блау
- Кахексия
- Болезнь отложения пирофосфата кальция (CPPD)
- Болезнь Кастлемана
- Криопирин-связанные периодические синдромы (CAPS)
- 45 - Дефицит антагониста рецептора интерлейкина-1 (DIRA)
- Дерматомиозит (болезнь Вагнера)
- Болезнь Эльдгеймера-Честера
- Эрозивный остеоартроз

- Семейная средиземноморская лихорадка
- Генерализованный пустулезный псориаз
- Подагра и псевдоподагра
- Болезнь «трансплантат против хозяина»
- 5 - Гнойный гидраденит
- Гипер-IgD-синдром (HIDS)
- Идиопатическая холодовая крапивница
- Миозит с включенными тельцами
- Воспалительное заболевание кишечника (IBD)
- 10 - Ишемическое повреждение
- Синдром активации макрофагов
- Синдром Меджида
- Дефицит мевалонат-киназы
- Миелогенная и другие лейкомии
- 15 - Нейтрофильный панникулит
- Остеопороз
- Перемежающаяся лихорадка с афтозным стоматитом, фарингитом и аденитом (PFAPA)
- Полимиозит
- 20 - Псориаз
- Гангренозная приодермия, конглобатные угри и асептический артрит (PAPA)
- Рецидивный идиопатический перикардит
- Рецидивирующий полихондрит
- Реперфузионное повреждение
- 25 - Ревматоидный артрит (RA)
- Синдром Шницлера
- Сепсис, септический синдром
- Вялотекущая миелома
- SAPHO-синдром - комбинация синовита, акне, пустулеза, гиперостоза, остита
- 30 - Ювенильный идиопатический артрит с системным началом (SoIA)
- периодический синдром, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (TRAPS)
- Диабет 1 типа
- Диабет 2 типа
- 35 - Уртикарный васкулит
- Увеит.

В предпочтительной форме изобретения фармацевтическую композицию вводят подкожной инъекцией млекопитающему, включая человека, нуждающемуся в этом. В соответствии с изобретением ноцицептивная боль на месте подкожной инъекции
40 исключена или уменьшена. Определение «ноцицептивная боль» подразумевает нервную активность, инициируемую ноцицепторами (болевыми рецепторами).

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Стабильность относительно видимой агрегации

- Замороженный раствор анакинры в 10 мМ цитрате натрия, 140 мМ NaCl и 0,5 мМ
45 ЭДТУ, полученный от Amgen Manufacturing, размораживают и диалфильтруют с использованием системы Millipore ProFlux™ M12, включающей мини-кассету 0,1 м² Millipore Pellicon 2™, имеющую 10 kDa композитную мембрану из регенерированной

целлюлозы PLC10 membraneTM (www.millipore.com). Полученные растворы концентрируют путем ультрафильтрации в соответствии со стандартными методами.

Композиции, описанные в таблице I, готовят из полученных диафильтрованных и сконцентрированных растворов. Помимо ингредиентов, показанных в таблице I, все композиции содержат 150 мг/мл анакинры, 0,5 мМ ЭДТУ и 0,1% Полисорбата 80. Растворами заполняют силиконизированные стеклянные шприцы (1 мл), которые хранят в течение 1 месяца (+5°C или +25°C) или в течение 3 месяцев (+5°C).

Композиция	NaCl (мМ)	Буфер (10 мМ)	pH
E	120	Цитрат натрия	6,2
G	120	Фосфат натрия	6,2
H	120	Гистидин	6,2
O	120	-	6,5
R	120	Цитрат натрия	6,5
S	240	Цитрат натрия	6,5
T	120	Фосфат натрия	6,5
U	120	Фосфат натрия	6,8

Растворы в таблице I испытаны на невидимые невооруженным глазом частицы с помощью технологии оптического затенения в соответствии с Фармакопеей Соединенных Штатов - National Formulary (USA-NF), Chapter 905 (www.usp.org), но скорректированной к небольшому объему образца. В каждой временной точке образцы из 3 шприцев объединяют и испытывают. В каждом пуле определяют число частиц больше чем 5, 7,5 и 10 мкм по размеру. Результаты показаны в таблице II и на фиг. 1-3. Типичные результаты в случае невидимых невооруженным глазом частиц в парентеральных продуктах находятся в интервале меньше чем 6000 частиц размерами больше чем 10 мкм.

Композиция	Начало	1 месяц, +5°C	1 месяц, +25°C	3 месяца, +5°C
	Частицы (>5 мкм)/мл			
E	221	282	562	477
G	229	113	270	324
H	162	323	418	476
O	223	249	386	584
R	270	528	771	373
S	136	266	524	421
T	272	451	517	533
U	154	456	468	549

Измеренное количество невидимых невооруженным глазом частиц указывает на то, что видимая агрегация анакинры относительно невелика, повышается незначительно со временем и не зависит от присутствия буфера. Данные показывают, что анакинра может быть составлена в композиции без цитрата натрия и с эквивалентной стабильностью.

Пример 2: Агрегационная устойчивость

Композиции анакинры готовят и хранят, как описано в примере 1. Содержание мономера измеряют с помощью гелипроникающей (эксклюзионной) хроматографии (ГПХ, SEC). Каждый образец разбавляют 10 мМ цитрата натрия, 140 мМ NaCl и 0,5 мМ ЭДТУ до концентрации анакинры 5 мг/мл. Разбавленный образец загружают на

колонку TSK-Gel G2000 SWXL, 7,8 мм × 30 см (ToSoh Biosciences 08450), и элюируют с помощью 10 mM цитрата натрия, 140 mM NaCl и 0,5 mM ЭДТУ при скорости потока 0,5 мл/мин. Записывают поглощение при 280 нм и рассчитывают % мономера из соответствующих площадей пика.

5 Результаты (таблица III) показывают, что уровень мономера анакинры остается устойчивым в течение 3 месяцев во всех изученных композициях анакинры.

10 Таблица III
Устойчивость различных композиций анакинры

Композиция	Начало	1 месяц, +5°C	1 месяц, +25°C	3 месяца, +5°C
Е	99,8	99,8	99,2	99,7
Г	99,9	99,8	99,1	99,7
Н	99,8	99,8	99,1	99,7
О	99,9	99,8	99,0	99,7
15 R	99,8	99,8	99,0	99,7
S	99,9	99,8	99,2	99,7
T	99,9	99,8	98,7	99,7
U	99,8	99,8	98,6	99,6

Пример 3: Устойчивость рН

20 Композиции анакинры готовят и хранят, как описано в примере 1. Измеряют значение рН в соответствии со стандартными методиками. Результаты (таблица IV) показывают, что значение рН остается устойчивым в течение 3 месяцев во всех изученных композициях анакинры.

25 Таблица IV
Устойчивость рН различных композиций анакинры

Композиция	Начало	1 месяц, +5°C	1 месяц, +25°C	3 месяца, +5°C
Е	6,1	6,1	6,1	6,1
Г	6,1	6,0	6,0	6,1
Н	6,1	6,1	6,1	6,2
30 О	6,1	6,0	6,0	6,1
R	6,2	6,2	6,2	6,2
S	6,1	6,0	6,0	6,1
T	6,4	6,4	6,4	6,5
U	6,7	6,7	6,7	6,7

35 Пример 4: Стабильность композиций анакинры, содержащих фосфат и маннит

Замороженный раствор анакинры в 10 mM цитрата натрия, 140 mM NaCl и 0,5 mM ЭДТУ собственного производства размораживают и диафильтруют с использованием системы Millipore ProFlux™ M12, включающей мини-кассету 0,1 м² Millipore Pellicon 2™, имеющую 10 kDa композитную мембрану из регенерированной целлюлозы PLC10 membrane™ (www.millipore.com). Полученные растворы концентрируют путем ультрафильтрации в соответствии со стандартными методами.

45 Композиции, описанные в таблице V, готовят из полученных диафильтрованных и сконцентрированных растворов. Помимо ингредиентов, показанных в таблице V, все композиции содержат 150 мг/мл анакинры. Растворами заполняют силиконизированные стеклянные шприцы (1 мл), которые хранят при разных температурах, чтобы испытать стабильность анакинры в таких композициях. Образцы хранят в течение 1 месяца при +30°C и в течение 4 месяцев при +25°C.

5

Композиция	NaCl, mM	Буфер	Маннит	Полисорбат 80	ЭДТУ	pH
A	145	10 mM цитрата натрия	0	0,1%	0,5 mM	6,3
C	145	10 mM фосфата натрия	10 мг/мл	0,1%	0,5 mM	6,3
D	145	10 mM фосфата натрия	0	0,1%	0,5 mM	6,3
D2	145	10 mM фосфата натрия	10 мг/мл	0,01%	0,1 mM	6,3

10
15
20

Содержание мономера измеряют с помощью гельпроникающей (эксклюзионной) хроматографии (ГПХ, SEC) после хранения при каждой температуре. Каждый образец разбавляют 10 mM цитрата натрия, 140 mM NaCl и 0,5 mM ЭДТУ до концентрации анакинры 5 мг/мл. Разбавленный образец загружают на колонку TSK-Gel G2000 SWXL, 7,8 мм × 30 см (ToSoh Biosciences 08450), и элюируют с помощью 10 mM цитрата натрия, 140 mM NaCl и 0,5 mM ЭДТУ при скорости потока 0,5 мл/мин. Записывают поглощение при 280 нм и рассчитывают % мономера из соответствующих площадей пика. Результаты гельпроникающей хроматографии (SEC), представленные в таблице VI, показывают, что уровень мономера анакинры остается стабильным в течение до 4 месяцев, во всех изученных композициях анакинры.

20

Композиция	Начало	1 месяц, +30°C	2 месяца, +25°C	4 месяца, +25°C
		% мономера по данным ГПХ		
A	99,8	95,3	96,8	92,9
C	99,8	95,5	96,9	93,1
D	99,8	95,0	96,6	92,3
D2	99,8	95,7	97,0	93,2

25
30

Кроме того, белок, такой как анакинра, как правило, чувствителен к изменениям pH. Чтобы оценить любое влияние pH на анакинру, в проведенных исследованиях записывают значения pH в композициях. Результаты представлены в таблице VII и показывают повышение pH со временем, но это изменение не связано с композицией, и представленные различия в содержании мономера в таблице VI не вызваны разницей в значениях pH.

35

Композиция	Начало	1 месяц, +30°C	2 месяца, +25°C	6 месяцев, +5°C
		Значение pH		
A	6,3	6,3	6,5	6,5
C	6,3	6,3	6,5	6,4
D	6,3	6,3	6,5	6,5
D2	6,3	6,3	6,5	6,5

Пример 5: Эффект композиций анакинры в тесте Харгривса

40

Цель таких исследований состоит в сравнении действия разных композиций анакинры (цитратный буфер или буфер фосфат/маннит) на термический болевой порог и объем задней лапы у самцов крыс Sprague-Dawley (Hargreaves et al., 1988).

45

В правую заднюю лапу делают внутривенное введение гистамина (50 мкл/ лапа, 3 мг/мл), цитратного буфера (10 mM, pH 6,3) или фосфатного буфера (10 mM, pH 6,3) с анакинрой или без анакинры (150 мг/мл). Образование отека, измеренное в виде увеличения объема лапы, через 2 часа указывает на то, что цитратный буфер и забуференная цитратным буфером анакинра, а также анакинра, забуференная буфером фосфат/маннит, вызывают острое воспаление (Фиг. 4). Буфер фосфат/маннит не

вызывает острого воспаления. Гистамин (0,15 мг/лапа), использованный в качестве положительного контроля, индуцирует термическую гипералгезию и образование отека.

В заключение необходимо отметить, что есть явное различие в распухании лапы через 2 часа между цитратным буфером и одним буфером фосфат/маннит. Кроме того, измерения объема лапы через 2 часа после инъекции для забуференной буфером фосфат/маннит анакинры показывают склонность вызывать меньшее образование отека в сравнении с забуференной цитратным буфером анакинрой.

Пример 6: Влияние композиций анакинры на проницаемость красителя эванс-голубого в крысах

Самцов крыс анестезируют изофлураном и шерсть на спине и боках осторожно сбывают с помощью машинки для стрижки волос, тщательно избегая повреждений. На обнаженной коже на спине и боках рисуют сетку с 8 квадратами с помощью маркера. Раствор эванс-голубого (1 мг/кг; Sigma Aldrich) вводят путем инъекции в латеральную хвостовую вену перед подкожной инъекцией тестовых растворов анакинры (1000 мкл) по случайной схеме в пределах квадратов сетки. После инъекции животных возвращают в их клетки и дают восстановиться от анестезии. Через 6 часов после инъекции животных усыпляют путем воздействия диоксида углерода. Кожу на спине снимают, очищают от жира и соединительных тканей и размещают на подставке пушистой стороной вниз. Размер зоны экстравазированного красителя эванс-голубого в миллиметрах измеряют с помощью сантиметровой рулетки и присваивают субъективные баллы в интервале от 0 до 4 реакции экстравазирования, исходя из интенсивности окрашивания красителя.

Вводят различные композиции анакинры, включая анакинру в «CSEP» (10 мМ цитрата натрия; 0,5 мМ ЭДТУ, 0,1% Полисорбата 80 и 140 мМ NaCl, pH 6,5), а также в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) в качестве контроля. Измеренные изменения в проницаемости указывают, что инъекция 1 мл PBS отдельно приводит только к незначительному просачиванию эванс-голубого красителя от места инъекции. Напротив, инъекция анакинры, растворенной при концентрации 100 мг/мл в CSEP, сильно повышает проницаемость.

Пример 7: Влияние композиций анакинры на ноцицептивную реакцию мышей

Чтобы оценить обезболивающее действие различных композиций анакинры на месте инъекции, используют модель облизывания задней лапы на мышах (Piovezan et al., 1998). Животных помещают по отдельности в камеры (прозрачные стеклянные цилиндры) и акклиматизируют в течение, по меньшей мере, 20 минут перед подкожной инъекцией различных испытуемых композиций анакинры, включая анакинру в CSEP (см. пример 6), а также PBS в качестве контроля. После провокации за мышами наблюдают индивидуально в течение 15-30 минут. С помощью секундомера измеряют продолжительность времени, затраченного на облизывание инъекционной лапы, и это время рассматривают в качестве показателя ноцицептивной реакции.

Пример 8: Эффект композиций анакинры в тесте «горячей пластины»

Чтобы оценить обезболивающие действия различных композиций анакинры на месте инъекции, используют экспериментальную модель термической гипералгезии на мышах (Kanaan et al., 1996). Животных акклиматизируют на горячей пластине прибора (Ugo Basil, Италия), предварительно нагретой до 30°C за 1-2 дня до испытания. На первый день испытания животные получают подкожную инъекцию различных испытуемых композиций анакинры, включая анакинру в CSEP (см. пример 6), а также PBS в качестве контроля. С экспериментатором, невидимым при обработке, мышей тестируют на горячей пластине, установленной на +52°C. Латентность реакции определяют как время до отдергивания задней лапы или прыжка.

Пример 9: Влияние различных композиций анакинры на дегрануляцию мастоцитов, *in vitro*

A23187 (кальциевый ионофор) и кривая доза-реакция IgE-анти-IgE выступают в качестве положительных контролей для активации мастоцитов. Выделяют мастоциты от 10 разных индивидуумов (5 из пуповинной крови и 5 от взрослых индивидуумов). Мастоциты выделяют посредством CD34-селекции (проточная цитометрия) гемопоэтических клеток, которые затем выращивают при 37°C, 5% CO₂ в бессывороточных условиях в присутствии рекомбинантного фактора стволовых клеток человека (Stemgen®) и IL-6 в течение 6-8 недель (Gulliksson M., et al., 2010). Степень дегрануляции мастоцитов после воздействия на клетки различных композиций анакинры оценивают путем измерения гистамина и PGD₂. Изменение в дегрануляции мастоцитов является критерием альтерации в уровнях активности мастоцитов, что является маркером для механизмов острой воспалительной боли.

Пример 10: Влияние подкожных композиций анакинры на внеклеточное высвобождение медиаторов боли на месте инъекции с использованием метода микродиализа

Чтобы изучить немедленное действие инъекции различных композиций анакинры, включая анакинру в CSEP (см. пример 6), а также PBS в качестве контроля, используют хорошо изученный метод для определения внеклеточных концентраций биохимических медиаторов боли (например, нейротрансмиттеров, нейромодуляторов, цитокинов и хемокинов острого воспаления). Во время опыта животных анестезируют ингаляцией изофлурана. Микродиализный зонд вставляют в дерму кожи в верхней части шеи каждого животного. Входную трубку микродиализного зонда соединяют с микроинфузионным насосом и подают насосом раствор Кребса-Рингера при скорости потока 1-10 мл/мин. Образцы собирают и анализируют на медиатор боли (например, с помощью ELISA) для каждого отдельного опыта (Weidner C., et al., 2000; и Yoshitake T., et al., 2012).

ССЫЛКИ

- Bedele A., Colloton M., Vrkljan M., Morris J and Sabados K. (1995): Cutaneous mast cell degranulation in rats receiving injections of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) and/or its vehicle: Possible clinical implications. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 493-500.
- Fransson J. and Espander-Jansson A. (1996): Local tolerance of subcutaneous injections. *J. Pharm. Pharmacol.* 48: 1012-1015.

- Frenken, L.A., van Lier, H.J., Jordans, J.G., Leunissen, K.M., van Leusen, R., Verstappen, V.M., Koene, R.A. (1993): Identification of the component part in an epoetin alfa preparation that causes pain after subcutaneous injection. *Am. J. Kidney Dis.* 22: 553-556.
- Gulliksson, M. et al. (2010) Mast cell survival and mediator secretion in response to hypoxia. *PLoS One* 5(8):e12360.
- Haller C., Cosenza M. and Sullivan J. (2008): Safety Issues Specific to Clinical Development of Protein Therapeutics. *Clin Pharmacol Ther.* 84(5): 624-627.
- Hargreaves K. et al. (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32: 77-88.
- Kanaan S.A. et al: (1996): Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain. *Pain* 66: 373-379.
- Laursen T., Hansen B and Fisker S. (2006): Pain Perception after Subcutaneous Injections of Media Containing Different Buffers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98: 218–221.
- Nema S., Brendel R. and Washkuhn R.: Excipients: Parenteral Dosage Forms and Their Role. In: Swarbrick, J. (Ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, third edition. Informa Healthcare, 2006.
- Piovezan A.P. et al. (1998): Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *European Journal of Pharmacology* 351: 15-22
- Raibekas A, Bures E., Siska C., Kohno T., Latypov R. and Kerwin B. (2005): Anion Binding and Controlled Aggregation of Human Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Biochemistry* 44: 9871-9879.
- Thaler K., Chandiramani D., Hansen R., and Gartlehner G. (2009): Efficacy and safety of anakinra for the treatment of rheumatoid arthritis: an update of the Oregon Drug Effectiveness Review Project. *Biologics* 3: 485–498.
- Wang J., Kowall R. (1980): Review of excipients and pH's for parenteral products used in the United States. *Journal of Parenteral Drugs* 34: 452-462.
- Winder C., et al. (2000): Acute effect of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin – A microdialysis study. *The Journal of Investigative Dermatology.* 115: 1015-1020.
- Yoshitake T., et al. (2012): Determination of histamine in microdialysis samples from Guinea pig skin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Skin Pharmacology Physiology* 25:65–72.

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, приемлемая для инъекции, содержащая:

- a) 100-200 мг/мл анакинры;
- (b) 0,05-1 мМ ЭДТУ;
- (c) 0,01-1% Полисорбата 80;
- (d) 120-180 мМ NaCl;
- (e) 1-50 мМ фосфата натрия, pH 6-7;

(d) 5-50 мг/мл маннита;

где указанная фармацевтическая композиция не содержит цитрата.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, содержащая:

(a) 150 мг/мл анакинры;

5 (b) 0,5 мМ ЭДТУ;

(c) 0,1% Полисорбата 80;

(d) 145 мМ NaCl;

(e) 10 мМ фосфата натрия, pH 6,5;

(d) 10 мг/мл маннита;

10 где указанная фармацевтическая композиция не содержит цитрата.

15

20

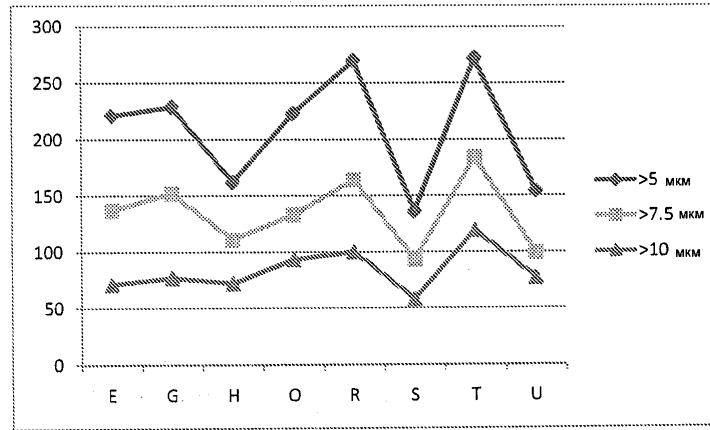
25

30

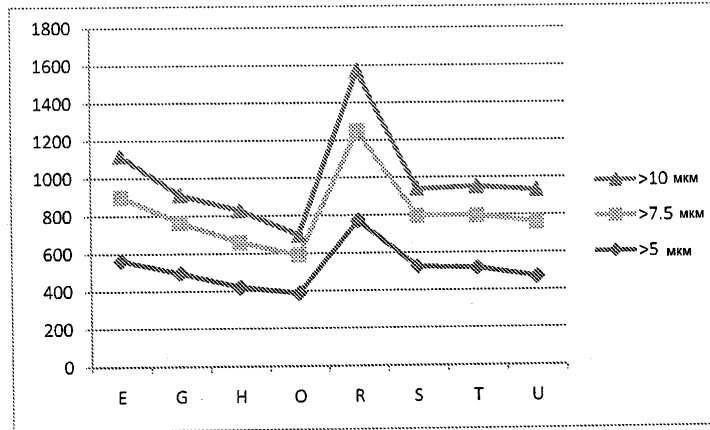
35

40

45

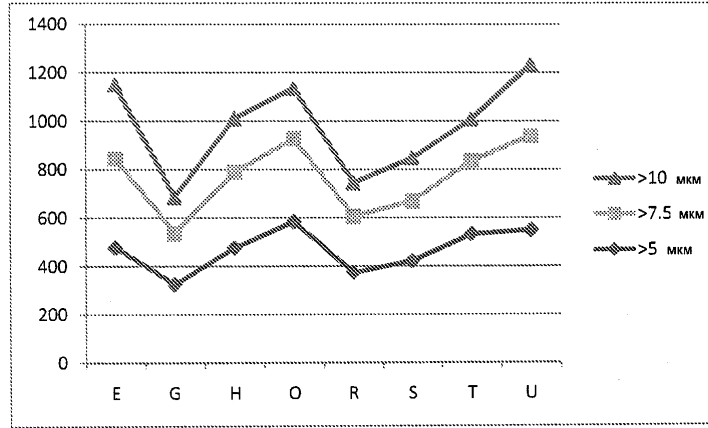


ФИГ. 1



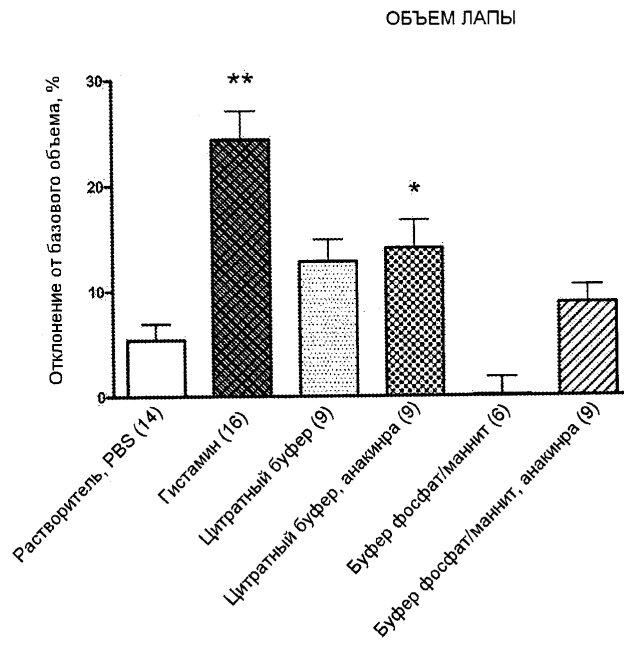
ФИГ. 2

3/4



ФИГ. 3

4/4



ФИГ. 4