



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 143 889** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **A 61 K 9/16, 9/22, 47/26**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95118293/14, 17.02.1994
(24) Дата начала действия патента: 17.02.1994
(30) Приоритет: 23.02.1993 US 08/021,421
(46) Дата публикации: 10.01.2000
(56) Ссылки: SU 1599019 A1, 15.10.90. EP 0256726 A, 24.02.88. EP 0251476 A, 07.01.88.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 23.09.1995
(86) Заявка PCT: US 94/01666 (17.02.1994)
(87) Публикация PCT: WO 94/19020 (01.09.1994)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул.Б.Спасская, д.25, стр.3, "Городисский и партнеры"

(71) Заявитель: Генентек, Инк. (US)
(72) Изобретатель: Джеффри Л.Кпилэнд (US), Эндрю Дж.С.Джоунс (GB)
(73) Патентообладатель: Генентек, Инк. (US)

(54) СПОСОБ СТАБИЛИЗАЦИИ ПОЛИПЕПТИДА, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ПОЛИПЕПТИДА И КОМПОЗИЦИИ

(57) Реферат:
Изобретение относится к медицине. Описаны способы и композиции для стабилизации наполнителями сухих и водных форм полипептидов, обрабатываемых органическими растворителями. Для этого полипептид смешивают с полиолом,

представляющим собой трегалозу, а затем обрабатывают органическим растворителем и инкапсулируют в полимерную матрицу, где полимер представляет собой полилактид. Способ обеспечивает защиту полипептида от денатурации при обработке органическим растворителем. 4 с. и 26 з.п.ф-лы, 8 табл.

RU 2 143 889 C1

RU 2 143 889 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 143 889** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 9/16, 9/22, 47/26**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 95118293/14, 17.02.1994
 (24) Effective date for property rights: 17.02.1994
 (30) Priority: 23.02.1993 US 08/021,421
 (46) Date of publication: 10.01.2000
 (85) Commencement of national phase: 23.09.1995
 (86) PCT application:
 US 94/01666 (17.02.1994)
 (87) PCT publication:
 WO 94/19020 (01.09.1994)
 (98) Mail address:
 129010, Moskva, ul.B.Spaskaja, d.25, str.3,
 "Gorodisskij i partnery"

(71) Applicant:
Genentek, Ink. (US)
 (72) Inventor: Dzheffri L.Klilehnd (US),
 Ehndrju Dzh.S.Dzhouns (GB)
 (73) Proprietor:
Genentek, Ink. (US)

(54) **METHOD OF STABILIZATION OF POLYPEPTIDE, AND METHODS OF PREPARING POLYPEPTIDE COMPOSITIONS**

(57) Abstract:
 FIELD: medicine. SUBSTANCE: described are methods and compositions for stabilization of dry and aqueous forms of polypeptides treated with organic solvents. To this end, polypeptide is mixed with polyol which is trehalose and is then

treated with organic solvent and encapsulated into polymeric matrix where polymer is polylactide. Method protects polypeptide from denaturation when treated with organic solvent. EFFECT: more efficient stabilization method. 31 cl, 4 ex, 8 tbl

RU 2 143 889 C 1

RU 2 143 889 C 1

Изобретение относится к применению наполнителей (основ) для стабилизации как сухих, так и водных препаратов полипептидов, обрабатываемых органическими растворителями.

Фармацевтические препараты полипептидов чувствительны к денатурации и деградации при изготовлении лекарственной формы и хранении. Для стабилизации белков и других макромолекул в водных препаратах и при воздушной сушке или лиофилизации из водных растворов использовались полиолы.

В патенте США 4297344 раскрывается стабилизация факторов коагуляции II и VIII, антитромбина III и плазминогена при нагревании путем добавления избранных аминокислот, таких как глицин, аланин, гидроксипролин, глютамин и аминокислотная кислота, и углевода, такого как моносахарид, олигосахарид или сахар-спирт.

В публикации Европейской патентной заявки N 0303746 раскрывается стабилизация гормонов, стимулирующих рост, с помощью полиолов, состоящих из невосстанавливающих сахаров, сахаров-спиртов, сахаров-кислот, пентаэритритола, лактозы, водорастворимых декстранов и фиколла, аминокислот, полимеров аминокислот, имеющих заряженные боковые группы при физиологическом pH, и солей холина.

В публикации Европейской патентной заявки N 0193917 раскрывается биологически активная композиция с медленным выделением активного вещества, отличающаяся тем, что представляет собой водный раствор комплекса, образованного белком и углеводом.

В Австралийской патентной заявке N AU-A-30771/89 раскрывается стабилизация гормона роста с использованием глицина и маннитола.

В патенте США 5096885 раскрывается рецептура человеческого гормона роста для лиофилизации, содержащая глицин, маннитол, неионный сурфактант и буфер.

Использование полиэтиленгликолей для стабилизации белков обобщается в Pharm. Res. 8:285-291, 1991.

Примеры использования трегалозы и других полиолов для стабилизации белков во время сушки в водных системах содержатся в следующих публикациях.

В патенте США N 4891319 раскрывается консервирование чувствительных протеинов и других макромолекул в водных системах с помощью высушивания при комнатной температуре и атмосферном давлении в присутствии трегалозы.

В патенте США 5149653 раскрывается метод консервирования живых вирусов в водной системе путем высушивания в замороженном состоянии или при комнатной температуре в присутствии трегалозы.

Полиолы также использовались для стабилизации сухих лекарственных форм, например, таких как в заявке WO 8903671, поданной 5 мая 1989, в котором раскрывается добавление стабилизатора, такого как желатин, альбумин, декстран или трегалоза, к смеси тонко измельченного лекарства, суспендированного в масляной среде.

Обработка полипептида органическим растворителем, таким как метиленхлорид, создает проблему денатурации

интересующего полипептида. Таким образом, цель данного изобретения состоит в создании способа стабилизации полипептидов в водных препаратах, обрабатываемых органическими растворителями.

Другой целью этого изобретения является стабилизация сухих полипептидов, обрабатываемых органическими растворителями.

Дополнительной целью изобретения является создание способа стабилизации инкапсулированных полипептидов.

Еще одной целью изобретения является получение полипептида, стабилизированного наполнителем (основой) для применения в лекарственной форме с регулируемым выделением, причем полипептид обработан органическим растворителем.

В одном аспекте изобретение представляет способ стабилизации полипептида от денатурации, при обработке органическим растворителем, причем способ включает смешивание полипептида с полиолом, при этом молекулярный вес полиола меньше примерно 70000 kD.

В другом аспекте изобретение представляет способ получения композиции полипептида, включающий

a) смешивание полипептида в водном растворе с полиолом, имеющим молекулярный вес меньше примерно 70000kD, и

b) обработку полипептида в водном растворе органическим растворителем.

В другом аспекте это изобретение представляет способ получения композиции сухого полипептида с регулируемым выделением, включающий

a) смешивание полипептида с наполнителем, причем указанный наполнитель является полиолом, имеющим молекулярный вес меньше примерно 70000 kD, и

b) обработку продукта со стадии a) органическим растворителем.

Еще в одном аспекте это изобретение представляет композицию с регулируемым выделением полипептида, содержащую полипептид, смешанный с наполнителем, причем наполнитель является полиолом, имеющим молекулярный вес меньше 70000 kD, при этом полипептид, смешанный с наполнителем, обрабатывается органическим растворителем и инкапсулируется в полимерную матрицу.

Термин "полиол", который используется в описании изобретения, обозначает углевод, содержащий по крайней мере два гидроксила, связанные с атомами углерода. Полиолы могут содержать другие функциональные группы. Примеры полиолов, применимых для практического осуществления данного изобретения, включают сахара-спирты, такие как маннитол и трегалоза, и полиэфиры.

Термин "полиэфир", который использован в описании, обозначает углевод, содержащий по крайней мере три эфирные связи. Полиэфиры могут включать другие функциональные группы. Полиэфиры, применимые для практического осуществления изобретения, включают полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Термин "сухой полипептид", который использован в описании, обозначает полипептид, который подвергся процедуре

высушивания, такой как лиофилизация, так что по крайней мере 50% влаги удаляется.

Термин "инкапсулирование" обозначает способ получения лекарственной формы терапевтического вещества, такого как полипептид в виде композиции, применимой для регулируемого выделения терапевтического вещества. Примеры инкапсулирующих материалов, применимых в данном изобретении, включают полимеры или сополимеры молочной и гликолевой кислот, или смеси таких полимеров и/или сополимеров, обычно называемые "полилактидами".

Термин "смешивание", который использован в описании, обозначает добавление наполнителя к интересующему полипептиду, таким образом, как смешивание сухих реагентов или смешивание сухого реагента с реагентом в растворе или суспензии, или смешивание водных форм реагентов.

Термин "наполнитель" ("основа"), который использован в описании, обозначает нетерапевтическое вещество, добавляемое к фармацевтической композиции для придания желаемой консистенции или для стабилизирующего действия.

Термин "органический растворитель", который использован в описании, предназначен для обозначения любого растворителя, содержащего соединения углерода. Примеры "органических растворителей" включают метилхлорид, этилацетат, диметилсульфоксид, тетрагидрофуран, диметилформамид и этанол.

"Обработка" полипептида органическим растворителем, как использовано в описании, относится к смешиванию сухого полипептида с органическим растворителем или приготовлению эмульсии полипептида в водной форме с помощью органического растворителя, создающего промежуточную поверхность между полипептидом в водной форме с помощью органического растворителя, или экстрагированию полипептида из водной формы органическим растворителем.

"Полипептид", как использовано в описании, относится в основном к пептидам и белкам, имеющим более 10 аминокислот.

Основные методы

В общем, как водные формы, так и сухие полипептиды могут смешиваться с основой для обеспечения стабилизирующего действия перед обработкой органическим растворителем. Водная форма полипептида может быть полипептидом в суспензии или в растворе. Обычно водная форма основы будет добавляться к водной форме полипептида, хотя может добавляться также и сухая основа, и наоборот. Водная форма полипептида и основы могут также высушиваться с помощью лиофилизации или другими способами. Такие высушенные формы могут восстанавливаться до водных композиций перед обработкой органическими растворителями.

Основа (или наполнитель), используемый для стабилизации полипептида, представляющего интерес, будет, обычно, полиолом с молекулярным весом менее примерно 70000 kD. Примеры полиолов, которые могут использоваться, включают

трегалозу, маннит и полиэтиленгликоль. Обычно, массовое отношение трегалозы к полипептиду составляет от 100:1 до 1:100, предпочтительно от 1:1 до 1:10, более предпочтительно от 1:3 до 1:4. Типичное массовое соотношение маннит и полипептида составляет от 100:1 до 1:100, предпочтительно от 1:1 до 1:10, более предпочтительно от 1:1 до 1:2. Обычно массовое соотношение ПЭГ и полипептида составляет от 100:1 до 1:100, предпочтительно от 1:1 до 1:10. Оптимальные соотношения выбираются на основе концентрации наполнителя, которая дает максимальную растворимость пептида при минимальной денатурации полипептида.

Композиции данного изобретения могут содержать консервант, буфер или буферы, множественные наполнители, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) в дополнение к трегалозе или маннит, или неионный сурфактант, такой как сурфактант Твин®. Неионные сурфактанты включают полисорбат, такой как полисорбат 20 или 80 и т.д., и полксамеры, такие как полксамер 184 или 188, полиолы Pluronic® и другие блоксополимеры этилена/полипропилена и т.д. Будут использоваться количества, эффективные для получения стабильной водной композиции, обычно в интервале от примерно 0,1% (вес/объем) до примерно 30% (вес/объем).

Буферы включают фосфатный, Трис, нитратный, сукцинатный, ацетатный или гистидиновый буферы. Наиболее целесообразно, чтобы концентрация буфера находилась в интервале от примерно 2 мМ до примерно 100 мМ. Предпочтительные буферы включают буферы с сукцинатом натрия и фосфатом калия.

Консерванты включают фенол, бензиловый спирт, метакрезол, метилпарабен, пропилпарабен, бензалкония хлорид, бензетония хлорид. Предпочтительными консервантами являются 0,2-0,4% (вес/объем) фенол и 0,7-1% (вес/объем) бензиловый спирт, хотя тип консерванта и интервал концентраций не принципиальны.

Вообще лекарственные формы как предмет этого изобретения могут содержать другие компоненты в количествах, не уменьшающих возможность получения стабильных форм, и в количествах, соответствующих эффективному и безопасному фармацевтическому применению. Например, другие фармацевтически приемлемые наполнители, хорошо известные специалистам, могут использоваться для приготовления части композиций - предмета изобретения. Сюда включаются, например, различные массообразующие средства, дополнительные буферные средства, хелатирующие вещества, антиоксиданты, сорстворители и тому подобное; конкретные примеры этих веществ могли включать тригидроксиметиламинные соли ("Трис буфер") и динатрий-эдетат.

Рассматриваемые полипептиды включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, такие как гормон роста, интерфероны и вирусные белки, такие как протеаза ВИЧ и 9p 120.

Стабилизированный полипептид данного

изобретения может быть приготовлен в виде лекарственной формы с длительным выделением, особенно потому, что экспозиция с органическими растворителями является обычной стадией при многих из таких процессов получения.

Соответствующие примеры препаратов с длительным выделением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие полипептид, причем эти матрицы представлены в виде сформированных частиц, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц с длительным выделением включают полиэферы, гидрогели [например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), который описан Langer, et al., J.Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) и Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) или поли(виниловый спирт)], полилактиды (патент США N 3773919, EP 58481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил- L-глутамата (Sigman, et al., Biopolymers, 22: 547-556 [1983]), недеградируемый этиленвинилацетат (Langer et al, выше), деградируемые сополимеры молочной кислоты-гликолевой кислоты, такие как Lupton Depot™ (инъекционные микросферы, образованные сополимером молочной кислоты-гликолевой кислоты и лейкопролид-ацетатом) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988). В то время как полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочной кислоты-гликолевой кислоты, обеспечивают выделение молекул в течение 100 дней, некоторые гидрогели выделяют полипептиды в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные полипептиды остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурироваться или агрегироваться в результате контакта с влагой при 37°C, приводящего в результате к потере биологической активности и возможным изменениям иммуногенности. Рациональная стратегия может быть разработана для стабилизации полипептида в зависимости от задействованного механизма. Например, если установлен механизм агрегации, состоящий в образовании межмолекулярных S-S связей посредством тиодисульфидного обмена, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, регулировки степени увлажнения с использованием соответствующих добавок и разработки конкретных полимерных матричных композиций.

Лигандные аналоги с длительным выделением или композиции с антителами также включают полипептиды, заключенные в липосомах. Липосомы, содержащие полипептиды, получают методами, известными per se: DE 3218121; Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52322, EP 36676, EP 88046, EP 143949, EP 142641, Японская патентная заявка 83-118008, патент США N 4485045; и патент США N 4544545, и EP 102324. Обычно эти липосомы - мелкие (примерно 200-800 Ангстрем), однослойного типа, в которых содержание липида больше примерно 30 мол.% холестерина, причем выбранная

пропорция доводится для оптимальной терапии лигандными аналогами. Липосомы с повышенным временем циркуляции раскрыты в патенте США N 5013556.

Пример I

5 Стабилизация водных форм препаратов
 Были приготовлены композиции рекомбинантного человеческого гормона роста (чГР) и рекомбинантного человеческого гамма-интерферона (γ -IFN) с различными основами для анализа воздействий основы на стабилизацию в органическом растворителе, метиленхлориде. Оптимальными рецептурами были в основном те, которые давали максимальные концентрации растворимого полипептида и наибольший выход нативного полипептида после обработки метиленхлоридом. Максимальную растворимость чГР в каждом растворе определяли посредством непрерывного добавления лиофилизированного чГР в аммоний-бикарбонатном буфере к раствору, и предел растворимости определяли как концентрацию, при которой добавление полипептида приводило к преципитации. Максимальную растворимость ч IFN- γ определяли путем добавления концентрированного стандартного раствора (264 мг/мл γ -IFN, 10 мМ сукцината натрия, pH 5) к концентрированному раствору основы. Видимый предел растворимости γ -IFN не наблюдался для каких-либо из этих композиций при этих условиях, но длительное хранение стандартного раствора приводило к преципитации в результате повышения pH (конечный раствор, pH 6). Рецептуры препаратов обоих полипептидов испытывали на стабильность в метиленхлориде путем добавления 10 мкл раствора полипептида к 1 мл метиленхлорида. Эту смесь затем обрабатывали ультразвуком в течение 30 сек. После обработки ультразвуком полипептид экстрагировали из органической фазы путем разведения в 50 мл буфера без основы (50 мМ фосфатный буфер, pH 8 для чГР; 10 мМ сукцинатный буфер, pH 5 для γ -IFN). Количество выделенного растворимого полипептида определяли путем измерения поглощения в ультрафиолетовой области и количество мономерного полипептида оценивали хроматографией исключения по размеру.

Оба полипептида испытывали на стабильность с трегалозой, маннитом, карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ), сурфактантом Твин® 20, декстраном, желатином и полиэтиленгликолем. Предыдущие исследования с чГР показали, что составы, содержащие равное отношение масс полипептида и маннита, стабилизировали полипептид от денатурации и обеспечивали максимальную концентрацию растворимого полипептида, равную 200 мг/мл (100 мМ фосфата, 2 мг/мл маннита, pH 8). Лекарственные формы трегалозы, содержащие соотношения масс основы к полипептиду, равные 1:4 и 1:3, давали самые высокие концентрации растворимого полипептида, 400 мг/мл и 300 мг/мл соответственно. Кроме того, когда лиофилизированный полипептид в этих композициях обрабатывали метиленхлоридом, достигалось полное извлечение растворимого мономерного чГР. Композиции чГР, содержащие маннит или

маннит с ПЭГ, давали в результате сходное выделение мономерного чГР, но соотношение масс (основа/полипептид), необходимое для предотвращения денатурации, было больше, чем соотношение в препаратах с трегалозой (маннит 1: 1, маннит/ПЭГ 1: 1 или 1:2, трегалоза 1:3 или 1:4) (таблица I). Поэтому трегалоза обеспечивала высокую растворимость чГР и защиту от денатурации в метиленхлориде при более низкой концентрации массы. В отсутствие наполнителей растворимость чГР была значительно ниже (примерно 106 мг/мл), и полипептид был более чувствителен к денатурации.

При исследованиях с чIFN- γ как маннит, так и трегалоза были наилучшими испытанными основами. Когда маннит использовали при массовом соотношении (наполнитель/полипептид), равном 1: 3, количество растворенного димера в растворе (что определено путем хроматографии исключения по размеру) после обработки метиленхлоридом было эквивалентно количеству в исходном материале. Однако рецептуры с маннитом давали менее 60% извлечения общего количества растворенного полипептида. Напротив, рецептуры с трегалозой с массовым отношением, равным 1:2,5, давали 80% извлечения общего количества полипептида и такую же фракцию растворенного димера (что определено по хроматографии исключения по размеру, обозначаемой нативная SEC-HPLC), что и в исходном материале (таблица II). Рецептуры с полипептидом без наполнителя, обработанные метиленхлоридом, сохраняли 10% первоначального количества растворенного димера (что определено ВЭЖХ исключения по размеру природного) после обработки метиленхлоридом, и в целом извлечение растворимого полипептида было менее 60%. При исследовании с помощью хроматографии исключения по размеру в 0,2 М NaPO₄/ 0,1% додецилсульфате при pH 6,8 (обозначаемой SDS SEC-HPLC) во всех рецептурах было более 99% мономера до и после обработки метиленхлоридом.

Для обоих полипептидов наблюдалось заметно более низкое обнаружение мономерного полипептида после обработки метиленхлоридом во всех рецептурах, содержащих сурфактант Твин[®] 20. Хотя другие сурфактанты не были изучены, вероятно, что гидрофобные молекулы, такие как сурфактант Твин[®] 20, стабилизируют денатурируемые полипептиды, тогда как сахара, такие как маннит и трегалоза, стабилизируют природный полипептид.

Пример II

Стабилизация сухих и водных рецептур для инкапсулирования

В разработке рецептуры длительного действия для рекомбинатного человеческого гормона роста исследовали использование биodeградируемой полимерной матрицы для длительного выделения чГР. Полимер, использованный с этой целью, представлял собой сополимер молочной и гликолевой кислот, который часто называют поли(молочная/гликолевая кислота) или ПМГК (PLGA). Для включения чГР в этот полимер ПМГК должен быть растворен в несмешиваемом с водой растворителе. Наиболее часто используемый растворитель

для растворения ПМГК - это метиленхлорид, который обеспечивает растворение ПМГК и не смешивается с водой. В основном, для получения микросфер чГР-ПМГК полипептид добавляли к раствору метиленхлорида, содержащему ПМГК. В первоначальных исследованиях полипептид добавляли в форме измолотого лиофилизированного порошка. После добавления полипептида метиленхлоридный раствор быстро гомогенизировали и этот раствор помещали в ванну для эмульгирования. Этот процесс приводил к экстракции метиленхлорида с одновременным образованием микросфер ПМГК, содержащих чГР. Затем исследовался полипептид, выделенный из этих микросфер, для определения целостности чГР после включения в микросферы. Оценку выделенного чГР осуществляли с помощью аналитической хроматографии исключения по размеру (SEC-HPLC), а также другими методами. Хроматография исключения по размеру показала, что чГР выделялся из микросфер ПМГК в форме природного мономера, агрегатов и неизвестной структуры, которая элюировалась между мономером и димером. Неизвестная полипептидная структура была интенсивно изучена, и как было показано, является конформационным вариантом чГР. Кроме того, те же самые агрегаты и конформационный вариант могут получаться при обработке чГР метиленхлоридом. Таким образом, использование метиленхлорида в процессе может вызывать денатурацию и агрегацию чГР.

Выделение мономерного природного чГР из ПМГК микросфер необходимо для удачного состава длительно действующей лекарственной формы. В предшествующих исследованиях изучалось несколько органических растворителей в качестве альтернативы метиленхлориду. Это исследование показало, что чГР был чувствителен к разрушению несколькими органическими растворителями. Так как метиленхлорид обладал желаемыми свойствами растворителя (т.е. несмешиваемость с водой, растворение ПМГК и т.д.) для получения микросфер ПМГК, а другие растворители значительно не улучшали стабильность чГР, для производства микрокапсул ПМГК был выбран метиленхлорид. Полипептид, использованный для изучения растворителей и при процессе получения ПМГК, использовался в процессе приготовления лекарственной формы и лиофилизировался в аммоний-бикарбонатном буфере с pH 7. Таким образом это исследование было выполнено для разработки рецептуры лекарственной формы, которая стабилизировала бы чГР при получении микросфер ПМГК.

A. Методы

1. Получение композиций чГР

Для разработки рецептуры, устойчивой к метиленхлориду, чГР, лиофилизированный в аммоний-бикарбонатном буфере, растворяли в желаемом буфере и давали ему полностью раствориться. Нерастворившийся полипептид удаляли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Для каждой лиофилизации, рассмотренной ниже, концентрация чГР составляла 10 мг/мл. Остаточная влажность

этих препаратов не определялась, но использовался один и тот же цикл лиофилизации в каждом случае.

Размол лиофилизированного белка выполняли с помощью пневматической ударной мельницы и получали в результате тонкое измельчение чГР.

2. Испытание рецептур лекарственных форм чГР метиленхлоридом

Действие метиленхлорида на стабильность чГР определяли путем добавления чГР к раствору метиленхлорида. При условии твердого чГР отношение массы полипептида (мг) к объему органического растворителя (мл) составляло 40 мг/мл. При условии водной формы чГР 100 мкл чГР в буферном растворе добавляли к 1,0 мл метиленхлорида, чтобы оценить воздействие каждой буферной системы на стабилизацию чГР в метиленхлориде. После добавления полипептида образцы обрабатывали ультразвуком в течение 30 секунд в ванне ультразвукового аппарата при 47 кГц (Cole Parmer, модель 08849-00) для воспроизведения стадии гомогенизации при процессе производства микросфер. Если рецептура стабилизировала чГР от денатурации при этом испытании ее дополнительно оценивали по гомогенизации в метиленхлориде. После обработки ультразвуком и гомогенизации полипептид экстрагировали из метиленхлорида путем разведения в 50 раз избытком 5 мМ NaHPO_4 , pH 8. Количество и качество полипептида, экстрагированного на этой стадии, определяли с помощью измерения концентрации полипептида (поглощения при 278 нм) и в помощью ВЭЖХ исключения по размеру (SEC-HPLC). Предпочтительной стабильной рецептурой была рецептура, которая давала максимальный выход мономерного полипептида без образования конформационных вариантов или агрегатов больших, чем димеры.

В. Результаты

1. Изучение наполнителей по стабилизации чГР

При первоначальном изучении чГР, лиофилизированного в бикарбонате аммония, исследовали растворимость полипептида в различных буферах в условиях разных pH. При этих исследованиях было определено, что чГР обладает максимальной растворимостью и стабильностью в фосфатном буфере (5-10 мМ) при pH 8, и таким образом дополнительные исследования выполняли с чГР в этом буфере.

Первоначальные попытки предотвратить агрегацию чГР состояли в использовании сурфактанта Твин[®] 80 в рецептуре буфера. Как показано в таблице III, испытание рецептур этих водных препаратов с метиленхлоридом показало, что низкие концентрации сурфактанта Твин[®] (0,1% сурфактант Твин[®] 80) с 10% маннита обеспечивали хорошее извлечение растворенного мономерного полипептида. Однако наилучшие результаты в этом эксперименте были получены для чГР, который готовило в форме раствора с 10 мг/мл маннита без сурфактанта Твин[®] 80 (5 мМ NaHPO_4 , pH 8). Более высокие концентрации сурфактанта Твин[®] в

рецептуре буфера приводили к повышенной агрегации и сниженному извлечению растворенного полипептида. В каждом случае, представленном в таблице III, рецептуры обеспечивали более высокую стабилизацию чГР, чем в случае размолотого полипептида, который был лиофилизирован в бикарбонате аммония.

Испытание с метиленхлоридом твердых рецептур чГР представлено в таблице IV. Эти результаты показали, что рецептура, которая лучше всего стабилизировала белок, содержала 5 мМ KPO_4 , 2,5 мг/мл трегалозы.

Провели дополнительные исследования с целью определения, может ли сурфактант стабилизировать поверхность раздела метиленхлорида-полипептида. Так, сурфактант Твин[®] добавляли к метиленхлоридной фазе и смешивали с твердым чГР (KPO_4 , pH 8). Добавление сурфактанта Твин[®] к фазе метиленхлорида не улучшало стабильности твердого чГР (KPO_4 , pH 8), как показано в таблице IV. Кроме того, использование сурфактанта, сурфактанта Спэн[®] 80, в метиленхлоридной фазе не улучшают стабильности твердого чГР (KPO_4 , pH 8). Дополнительные попытки по получению более стабильной твердой рецептуры чГР (маннит KPO_4 , pH 8) с помощью сурфактанта Твин[®] в метиленхлоридной фазе были безуспешными. Эти результаты вместе с исследованиями водных рецептур показали, что предпочтительно не использовать сурфактант Твин[®] с этими рецептурами, так как он вызывает агрегацию и снижает растворимость обработанного метиленхлоридом чГР.

Для увеличения количества полипептида, заключенного в микросферы, количество наполнителя должно быть сведено к минимуму. Поэтому использовали более низкие концентрации маннитола (2 и 5 мг/мл), с 10 мг/мл чГР использовали в буфере для рецептуры (10 мМ NaHPO_4 , pH 8,0) и водные растворы испытывали на стабильность в метиленхлориде.

Эти концентрации маннита давали на 20% менее растворенного мономера, чем рецептура с 10 мг/мл маннита. Значительное снижение концентрации маннита приводило бы к потере качества выделяемого полипептида. Предпринимались также попытки использования альтернативных наполнителей при более низких концентрациях. В рецептурах водных композиций (10 мг/мл чГР, 10 мМ NaHPO_4 , pH 8) использовали карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) при концентрациях 0,5, 2 и 5 мг/мл. КМЦ при концентрации 0,5 мг/мл обеспечивала такую же фракцию растворенного мономера, что и 10 мг/мл маннита в рецептуре, но количество полипептида, обнаруженного в водной фазе, было на 15% ниже. Смеси равных масс КМЦ и маннита (1 мг/мл и 2,5 мг/мл каждого) также применяли при попытке обеспечить стабильность при более низких концентрациях наполнителя. Использование 2,5 мг/мл каждого наполнителя давало сравнимые результаты с рецептурой с 10 мг/мл маннита. Поэтому лиофилизировали рецептуры с 0,5 мг/мл КМЦ и с 2,5 мг/мл каждого из КМЦ и маннита для оценки возможности их использования при

микроинкапсулировании.

Для оценки рецептур для использования в водном препарате лиофилизированный материал воспроизводили до максимальной растворимости, которую определяли как концентрацию полипептида, при которой добавляемый полипептид не растворялся бы в растворе. Максимальная концентрация чГР в этом эксперименте достигалась с рецептурой, лиофилизированной с 10 мг/мл маннита. Эта рецептура успешно воссоздавалась с помощью 5 мМ NaHPO_4 буфера, pH до концентрации 200 мг/мл чГР (200 мг/мл маннита, 100 мМ KPO_4) без выпадения полипептида в осадок. Рецептура без наполнителей (KPO_4 , pH 8) давала вторую наилучшую растворимость чГР с 165 мг/мл. Однако попытки воспроизвести рецептуры с КМЦ и КМЦ/маннитом с высокими концентрациями полипептида были безуспешными. В обоих случаях рецептура образовывала пасту с концентрацией более 100 мг/мл. Испытание с метиленхлоридом паст, образованных рецептурами с КМЦ и КМЦ/маннитом, выявило, что количество извлеченного полипептида было значительно снижено (менее 75% извлечения) по сравнению с маннитной рецептурой, но растворенная фракция представляла более 95% мономера. Так как гелеподобная рецептура может быть полезной для стабилизации водной фазы в ходе процесса, была предпринята попытка использовать другое уплотняющее средство, желатин. Чтобы сохранить низкую концентрацию наполнителя и в то же время все же получить гель для конечной рецептуры (200 мг/мл чГР), желатиновую рецептуру испытывали при концентрациях 0,5 мг/мл желатина, 10 мг/мл чГР, 10 мМ KPO_4 , pH 8. Испытание с метиленхлоридом этой рецептуры давало извлечение растворенного мономера, которое сравнимо с рецептурой 10 мг/мл маннита. Поэтому эту рецептуру также лиофилизировали для дальнейшего анализа. Воспроизведение лиофилизированного полипептида при концентрации 200 мг/мл чГР (10 мг/мл желатина, 100 мМ KPO_4 , pH 8) давало в результате образование пасты, которая обладала свойствами, сходными со свойствами рецептур с КМЦ/маннитом и КМЦ при той же самой концентрации чГР.

Пример III

Стабильность рецептур лекарственных форм рчГР в этилацетате

Микроинкапсулирование белков в биоразрушаемые полимеры часто требует использования органических растворителей для превращения полимера в растворимую форму. Полимер, обычно ПМГК, полилактид (ПМК) или полигликолид (ПГК) сначала растворяется в органическом растворителе, который полностью не смешивается с водой. Обычно используемыми органическими растворителями при этом процессе являются метиленхлорид и этилацетат. Эти два растворителя обладают разными физическими и химическими свойствами. Поэтому было необходимо оценить стабильность рецептур рчГР в обоих растворителях.

Испытание рецептур лекарственных форм рчГР на стабильность в этилацетате выполняли методом, сходным со способом, использованным при исследованиях с

метиленхлоридом в вышеприведенных примерах. Растворы рчГР с концентрацией 10 мг/мл готовили путем добавления лиофилизированного твердого рчГР (аммоний-бикарбонатная рецептура) к каждому составу. Как показано в таблице VI, составы готовили с 5 мМ KPO_4 , pH 8, и они содержали различные наполнители, ПЭГ (МВ 3350), Маннит, трегалозу и Твин[®] 20 или комбинации наполнителей. Каждую рецептуру рчГР (100 мкл) добавляли к 1 мл этилацетата и обрабатывали ультразвуком в течение 30 сек до образования эмульсии. Эту эмульсию затем смешивали с 10 мл 5 мМ KPO_4 , pH 8, что давало в результате общее разведение рчГР в 100 раз. Экстрагированный в буфер рчГР анализировали с помощью ВЭЖХ исключения по размеру. Некоторые рецептуры давали более чем 100% извлечение растворенного белка, показывая то, что количество белка, добавленное к эмульсии, было больше, чем установленное количество (0,1 мл x 10 мг/мл = 1 мг) в результате неточности измерений объема. Кроме того, извлечение растворимого белка и количество извлеченного мономера были в основном больше, чем количество рчГР в той же самой рецептуре, обработанной метиленхлоридом. В целом, извлечение растворенного белка было наибольшим для трегалозы (1 и 2 мг/мл), трегалозы с ПЭГ (10 мг/мл каждого), маннита с ПЭГ (10 мг/мл каждого) и маннита с Твин[®] 20 (10 мг/мл каждого). Однако только трегалоза (1 и 2 мг/мл) и маннит с Твин[®] 20 (10 мг/мл каждого) обеспечивали также высокое содержание мономера (более 97%). Рецептура с маннитом/Твин[®] 20 не обеспечивает достаточной растворимости для процесса микроинкапсулирования двойной эмульсии, и это требует отношения наполнителя к белку (по массе) 4:1. Таким образом, оптимальной рецептурой в этих экспериментах была рецептура с 1 мг/мл трегалозы (1:10 отношением наполнителя к белку и высокой растворимостью рчГР). Концентрацию контрольного рчГР определяли по поглощению при 278 нм и концентрацию рчГР в образце рассчитывали как 100-кратное разведение исходного материала на основе разведений, использованных в методе в целом (0,1 мл в 1 мл EtAc добавляли к 10 мл буфера).

Пример IV

Стабильность высушенных распылением рецептур рчГР в органических растворителях

Методика двойной эмульсии (вода-в-масле-в-воде) для микроинкапсулирования единственная может обеспечить среднюю лекарственную нагрузку в конечном продукте. Лекарственная нагрузка ограничивается растворимостью лекарства в воде и объемом водной формы лекарства, который может быть добавлен к полимеру в органическом растворителе. Объемы более чем 0,5 мл лекарства на грамм полимера обычно приводят в результате к большому первоначальному выходу лекарства из микросфер. Чтобы исключить эти трудности, можно попользоваться твердые лекарственные рецептуры вместо водного раствора лекарства. Таким образом, может использоваться процесс твердое-в-масле-в-воде для получения

микросфер с высокой лекарственной нагрузкой (более 10%) с низким до умеренного первоначальным выходом.

Твердая лекарственная рецептура, используемая для микроинкапсулирования, должна быть стабильной в органических растворителях и должна иметь небольшой размер частиц (1-5 мкм) относительно микросфер (30-100 мкм), чтобы дать возможность высокой нагрузки и низкого первоначального выхода лекарства. Для белковых препаратов один из методов получения мелких высушенных твердых частиц является сушка распылением. В недавнем сообщении Mumenthaler et al., Pharm. Res 11(1): 12-20 (1994) описан процесс сушки распылением препаратов рЧГР. Так как рЧГР легко денатурируется путем взаимодействий на поверхностях раздела, таких как воздух-жидкость, сушка распылением должна выполняться с сурфактантами в составе препаратов рЧГР. Однако, как отмечено выше, присутствие некоторых сурфактантов может оказывать отрицательное действие на стабильность рЧГР в метилхлориде. Высушенные распылением препараты рЧГР с разными сурфактантами и трегалозой, которые, как было рассмотрено выше, являются наилучшими для стабилизации водных рецептур препаратов рЧГР, испытывали на стабильность в метилхлориде и этилацетате.

Высушенный распылением рЧГР готовили для каждой из рецептур, перечисленных в таблице VII. Эти препараты распыляли при расходе 5 мл/мин с температурой на входе, равной 90°C, при скорости потока воздуха в сопле, равной 600 л/час, и скорости воздуха для сушки, равной 36000 л/час. Высушенный распылением рЧГР затем собирали с фильтра и из циклонов распылительной сушилки. Конечные частицы твердого вещества обычно были примерно диаметром 5 мкм.

Порошок высушенного распылением рЧГР затем испытывали на стабильность при обработке или этилацетатом, или метилхлоридом. Высушенный распылением порошок массой, эквивалентной 10 мг рЧГР, добавляли к 2 мл органического растворителя в 3 см³ стеклянной пробирке для испытания. Суспензию затем гомогенизировали при 10000 об/мин в течение 30 сек с наконечником для микротонкой гомогенизации. После перемешивания 20 мкл гомогенизированной суспензии добавляли к 980 мкл 5 мМ КРО₄, рН 8,0 для экстракции белка. Концентрацию экстрагированного белка определяли по поглощению при 278 нм и образец также анализировали с помощью хроматографии исключения по размеру. Как показано в таблице VII, рецептура без сурфактанта давала наивысшую степень агрегации при обработке метилхлоридом. Эта агрегация была, вероятно, результатом денатурации на поверхности рЧГР во время процесса сушки, что ранее наблюдалось для сушки распылением рЧГР. Путем добавления или Твин® 20, или ПЭГ (МВ 3350) в рецептуру уровень агрегации для образцов, образованных метилхлоридом, был снижен, но общий выход извлечения был все еще низким, и содержание мономера было значительно менее 90%. В противоположность этому, если те же самые

высушенные распылением композиции рЧГР, содержащие сурфактант, были обработаны этилацетатом, уровень агрегации был ничтожным и достигалось полное извлечение мономерного рЧГР. Следовательно, высушенные распылением рецептуры рЧГР, включающие трегалозу и/или Твин® для ПЭГ (МВ 3350), были стабильны в этилацетате, но не защищали белок от денатурации в метилхлориде.

Пример V

Стабильность высушенного распылением с замораживанием рецептур рЧГР в метилхлориде и этилацетате

Сушка распылением при высоких температурах может оказывать вредное действие на белок, и она дает белковые частицы, которые часто являются полыми сферами (Mumenthaler et al., Pharm. Res 11(1): 12-20 (1994)). Кроме того, трудно собрать мелкие частицы (1-5 мкм), необходимые для микроинкапсулирования, и общий выход этих частиц обычно очень низок (менее 50%). Альтернативной сушке распылением при высокой температуре является сушка распылением с замораживанием. Сушка распылением с замораживанием рецептур рЧГР дает в результате тонкие частицы (2-3 мкм), которые легко разбивались отдельно на очень мелкие твердые частички (менее 1 мкм). Этот тип твердого препарата предпочтителен для микроинкапсулирования в полимерную матрицу, так как он может обеспечить высокую нагрузку (возможно включить больше твердого вещества в микросферы размером 30-100 мкм) гомогенно диспергированного твердого белка (сниженный выброс благодаря тонкой суспензии).

Сушку распылением с замораживанием рЧГР выполняли с использованием рецептур, перечисленных в таблице VIII. Снова был необходим сурфактант для стабилизации рЧГР во время процесса распыления, но другие белки, которые не так легко денатурируются путем взаимодействий на поверхности, возможно, не будут требовать применения сурфактанта. Высушенный распылением с замораживанием рЧГР получали путем подачи рецептуры насосом со скоростью 5 мл/мин и работы воздушного сопла при скорости 600 л/час, как применялось и при сушке распылением при высокой температуре (Mumenthaler et al., Pharm. Res., 11(1): 12-20 (1994)). Растворы распыляли на открытый металлический лоток с жидким азотом. После распыления лоток помещали в предварительно охлажденный лиофилизатор, установленный на -30°C. Жидкому азоту давали испариться и затем белок лиофилизировали (первичное высушивание: -30°C, 100 мТорр, 52 часа; вторичное высушивание: 5°C, 100 мТорр, 18 часов). Конечный порошок затем удаляли и помещали в герметичные стеклянные сосуды до использования.

Высушенный распылением с замораживанием порошок рЧГР затем испытывали на стабильность путем обработки этилацетатом и метилхлоридом. Высушенный распылением с замораживанием порошок массой, эквивалентной 10 мг рЧГР, добавляли к 2 мл органического растворителя в 3 см³ стеклянной пробирке для испытаний. Затем суспензию гомогенизировали при 10000

об/мин в течение 30 сек с помощью наконечника для микротонкой гомогенизации. После перемешивания 20 мкл гомогенной суспензии добавляли к 980 мкл 5 мМ КРО₄, pH 8 для экстракции белка. Концентрацию экстрагированного белка определяли по поглощению при 278 нм и образец анализировали с помощью хроматографии исключения по размеру. Как показано в таблице VIII, высушенная распылением с замораживанием рецептура, содержащая ПЭГ, была более стабильна в метиленхлориде, чем рецептура, содержащая Твин[®] 20, что наблюдалось, как представлено выше, и для водных рецептур. Однако обе рецептуры не давали высокого извлечения мономерного рчГР. Когда те же самые рецептуры обрабатывали этилацетатом с обоими препаратами достигалось полное извлечение мономерного белка. Трегалоза в этих рецептурах обеспечивала стабилизацию от денатурации органическим растворителем (этилацетатом), тогда как сурфактанты, стабилизировали белок от денатурации на поверхности раздела во время сушки распылением с замораживанием. Таким образом, рецептуры, высушенные распылением с замораживанием, содержащие как трегалозу, так и сурфактант, будут обеспечивать полное извлечение рчГР из этилацетата.

Процент извлечения растворенного белка определяли как отношение концентраций из области общего пика образца и стандарта сравнения, умноженное на 100%. Концентрации рчГР в контроле и образце определяли по поглощению при 278 нм.

Формула изобретения:

1. Способ стабилизации полипептида от денатурации в органическом растворителе при обработке органическим растворителем, отличающийся тем, что включает смешивание полипептида с полиолом, причем полиол представляет собой трегалозу, для образования смеси и обработку смеси органическим растворителем.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что полипептид является гормоном роста.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что гормон роста является человеческим.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что полипептид является гамма-интерфероном.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что органический растворитель является метиленхлоридом.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что органический растворитель является этилацетатом.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что полипептид является сухим.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что полипептид является лиофилизированным.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 100 : 1 до 1 : 100.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 1 до 1 : 10.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 3 до 1 : 4.

12. Способ получения композиции полипептида с использованием денатурирующего органического

растворителя, включающий: а) смешивание полипептида в водном растворе с полиолом, который представляет собой трегалозу, а) обработку полипептида в водном растворе органическим растворителем.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что продукт стадии а) высушивают и повторно переводят в водную форму препарата.

14. Способ по п.12, отличающийся тем, что дополнительно включает получение композиции полипептида с регулируемым выделением.

15. Способ получения композиции сухого полипептида с регулируемым выделением с использованием денатурирующего органического растворителя, включающий: а) смешивание полипептида с наполнителем, причем указанный наполнитель является полиолом, представляющим собой трегалозу, б) обработку продукта со стадии а) органическим растворителем и с) инкапсулирование полипептида в полимерную матрицу.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что органический растворитель представляет собой метиленхлорид или этилацетат.

17. Композиция с регулируемым выделением полипептида, содержащая полипептид, смешанный с наполнителем, отличающаяся тем, что наполнитель является полиолом, представляющим собой трегалозу, причем полипептид, смешанный с наполнителем, обрабатывается органическим растворителем и инкапсулируется в полимерную матрицу, где полимер представляет собой полилактид.

18. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что полипептид, смешанный с наполнителем, представляет собой водный препарат.

19. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что полипептид, смешанный с наполнителем, является сухим.

20. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что полипептид, смешанный с наполнителем, лиофилизируется.

21. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что дополнительно включает буфер.

22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что буфер является фосфатным буфером.

23. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что буфер является сукцинатным буфером.

24. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что дополнительно включает консервант.

25. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 100 : 1 до 1 : 100.

26. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 1 до 1 : 10.

27. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 3 до 1 : 4.

28. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 100 : 1 до 1 : 100.

29. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 1 до 1 : 10.

30. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что массовое соотношение трегалозы и полипептида составляет от 1 : 3 до 1 : 4.

Таблица I

Испытание с метиленхлоридом водных препаратов чГР

Рецептура ^а	Извлеченный растворимый мономер ^б (мг/мл)	Максимальная раствори- мость ^с (мг/мл)
100 мг/мл (МВ 3350)	12,2	96,4
50 мг/мл ВЭГ	34,7	89,6
10 мг/мл ПЭГ	37,2	128,3
100 мг/мл маннит	66,0	98,0
50 мг/мл маннит	46,2	106
10 мг/мл маннит	56,0	106
100 мг/мл декстран 70	34,6	112,6
50 мг/мл декстран 70	64,6	146,1
10 мг/мл декстран 70	38,4	167,1
2% КМЦ	44,7	91,9

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица I, продолжение

100 мг/мл трегалоза	113,9	267,3
50 мг/мл трегалоза	82,8	275
10 мг/мл трегалоза	92,0	267,3
4 мг/мл ПЭГ (3350-МВ)		
96 мг/мл маннит	102,6	243,7
10 мг/мл ПЭГ (МВ 3350),		
90 мг/мл маннит	104,0	184
20 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)		
80 мг/мл маннит	139,9	240
2% желатин	21,9	70,5
100 мг/мл ПЭГ (МВ 1000)	69,2	131,5
50 мг/мл ПЭГ	84,3	246,5
10 мг/мл ПЭГ	126,5	226,3
4 мг/мл ПЭГ (МВ 1000)		
96 мг/мл трегалоза	122,3	230,3
10 мг/мл ПЭГ (МВ 1000)		
90 мг/мл трегалоза	58,4	218,7
20 мг/мл ПЭГ (МВ 1000)		
80 мг/мл трегалоза	75,3	207,5
Без наполнителя	65,0	106,3

- а Все растворы содержали 10 мМ NaPO_4 , рН 8
- б Полипептид, экстрагированный из метилхлорида (фракция в целом), который определен по поглощению при 278 нм увеличивали фракцией мономера, обнаруженного по SEC-NPQC. Полипептид обрабатывали при максимальной растворимости.
- с Максимальную растворимость определяли как максимальное количество не включенного в лекарственную форму чГР, который растворился бы в каждом буфере.

Таблица II

Испытание с метиленхлоридом водных рецептур лекарственных форм

Рецептура ^a	% обнару- женного растворен- ного поли- пептида ^b	% интактно- го димера ^c	Растворен- ный ди- мер ^d
0,01% Твин [®] 20*	36,1	49,0	11,1
0,01% Твин [®] 20* 62 мг/мл маннит	59,0	69,0	25,6
5 мг/мл маннит	58,3	72,7	56,8
50 мг/мл маннит	62,9	83,4	70,3
5 мг/мл трегалоза	117	34,2	53,6
50 мг/мл трегалоза	75,6	61,3	62,1
1% КМЦ	78,2	62,5	65,5
Без наполнителя	51,6	6,0	7,9

^a Все растворы с наполнителем содержали 134 мг/мл ч *IFN-γ*, 10 мМ сукцината натрия, pH 5, рецептура "без наполнителя" содержала 256,3 мг/мл белка, 10 мМ сукцината натрия, pH 5,0.

^b Полипептид, экстрагированный из метиленхлорида (фракция в целом), который определяли по поглощению при 280 нм.

^c Количество интактного димера определяли по методу SEC-HPLC нативного. Все рецептуры давали > 99% мономера при исследовании методом SEC-HPLC в додецилсульфате натрия.

^d Концентрация растворенного димера (мг/мл) основывалась на количестве извлеченного растворенного полипептида и фракции димера (метод нативного SEC-HPLC).

* Концентрация полипептида в этих рецептурах была 62,8 мг/мл.

Таблица III

Испытание рецептур водных лекарственных форм ЧР с метиленхлоридом

Рецептура ^а	Извлеченный полипептид ^б	Зона обнаружения	Растворенный полипептид (Фракции по массе от общего)			
			% Тример	% Димер	% Промежуточное	% Мономер
1% Твин [®] 80	85,7	90,0	0,5	3,4	1,1	94,9
0,1% Твин [®] 80	70,9	98,3	2,0	3,6	1,8	92,6
1% Твин [®] 80 10% мг/мл маннит	65,0	97,8	3,3	3,4	3,4	90,0
0,1% Твин [®] 80 10 мг/мл маннит	70,9	98,3	0,0	2,2	0,0	97,8
10 мг/мл ПЭГ (3350 МВ)	97,6	101,1	0,0	2,6	0,0	97,4
10 мг/мл ПЭГ 10 мг/мл маннит	76,4	97,7	1,7	2,8	1,6	93,9
5 мМ NaPO ₄ , pH 8	55,3	99,4	0,0	3,2	0,0	96,8
5 мМ NaPO ₄ , pH 8 10 мг/мл маннит	91,7	99,8	0,0	1,8	0,0	98,2

^а Все растворы содержат 5 мМ NaPO₄ / pH 8

^б Полипептид, экстрагированный из метиленхлорида (фракция из общего), что определено по поглощению при 278 нм.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

^c Результаты SEC-HPLC для полипептида, экстрагированного в буфер после обработки метиленхлоридом.

Таблица IV

Испытание с метиленхлоридом твердых рецептур рчГР

Рецептура ^a	% извлеченный белок ^b	% зона обнаружения ^c	Растворенный белок (Фракция по массе от общего)			
			% Тример	% Димер	% Промежуточное	% Мономер
Измолотые твердые вещества						
NH_4CO_3	44,5	85,4	7,5	5,9	7,3	79,2
5 мМ NaPO_4 pH 8	85,7	100	0,0	2,1	0,0	97,8
5 мМ NaPO_4 pH 10 мг/мл маннит	87,6	100	0,0	3,0	0,0	97,0
Гомогенизированные твердые вещества ^d						
5 мМ KPO_4 pH 8 2,5 мг/мл трегалоза	97,3	100	0,0	2,2	0,0	97,8

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица IV, продолжение

5 мМ NaPO_4 рН 8 10 мг/мл маннит	96,8	100	0,0	2,0	0,0	98,0
0,3 М сук- цинат натрия 10 мг/мл ман- нит, рН 7	94,3	100	0,0	4,2	0,0	95,8

^a Все образцы лиофилизированы при 10 мг/мл рсГР с буфером и наполнителями, как представлено.

^b Белок, экстрагированный из метиленхлорида (фракция из общего), который определяли по поглощению при 278 нм .

^c Результаты SEC-HPLC по белку, экстрагированному в бу-
фер после обработки метиленхлоридом.

^d Твердые лиофилизированные рецептуры гомогенизировали в метиленхлориде при 25000 об/мин в течение 1 мин.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица У

Действие сурфактанта Твин® в метиленхлоридной фазе на стабильность твердого чПР

Твин в CH_2Cl_2	% извлеченный полипептид ^а	% зона обнаружения ^б	Растворенный полипептид (Фракция по массе от общего)			
			% тример	% димер	% промежуточное	% мономер
0,01% Твин® 80	40,8	98,7	5,2	13,0	0,0	81,8
0,1% Твин® 80	40,8	102,9	8,0	14,0	0,0	77,9
1,0% Твин® 80	53,8	97,3	7,0	11,6	0,0	81,4

^а Полипептид, экстрагированный из метиленхлорида (фракция от общего), который определяли по поглощению при 278 нм.

^б Результаты SEC-NPLC по полипептиду, экстрагированному в буфер после обработки метиленхлоридом.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица У1

Испытание с этилацетатом водных рецептур лекарственных форм рчГР,
как описано в тексте

Рецептура ^а	Извлече- ния раст- воренно- го бел- ка ^б	Растворенный белок (Фракция по массе от целого)		
		% Большие агрегат.	% Димер	% Мономер
Без наполнителя	98,9	2,3	3,2	94,5
10 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)	99,8	2,7	2,3	94,9
5 мг/мл ПЭГ	108,5	1,7	3,0	95,2
2 мг/мл ПЭГ	107,2	1,8	3,8	94,3
10 мг/мл маннит	96,6	1,7	3,6	94,7
2 мг/мл маннит	86,3	4,1	3,8	92,2
10 мг/мл трегалоза	100,1	1,8	4,5	93,2
2 мг/мл трегалоза	119,8	0,4	2,0	97,7
1 мг/мл трегалоза	111,1	0,6	2,3	97,1
10 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)	115,6	3,8	2,9	93,3
10 мг/мл трегалоза				
2 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)				
2 мг/мл трегалоза	93,0	0,8	3,1	96,1
1 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)				
1 мг/мл трегалоза	95,8	4,5	3,3	92,2
10 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)				
10 мг/мл маннит	116,3	1,2	2,5	96,3

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица УІ (продолжение)

2 мг/мл ПЭГ (МВ 3350)				
2 мг/мл маннит	106,5	1,7	2,7	95,6
0/1% Твин® 20				
10 мг/мл маннит	122,8	0,8	1,6	97,6

^a Все первоначальные испытуемые растворы содержали 10 мг/мл рч ГР и 5 мМ КРС₄, рН 8, за исключением трех рецептур, в которых концентрации рчГР были меньше 10 мг/мл (без наполнителя: 9,39 мг/мл, 10 мг/мл маннита/10 мг/мл ПЭГ: 7,84 мг/мл, 10 мг/мл маннита: 9,71 мг/мл).

^b Результаты SEC-HPLC для белка, экстрагированного в буфер после обработки этилацетатом. Процент извлечения растворенного белка определяли как отношение концентраций из области общего пика образца и существующих контролей (той же рецептуры), умноженное на 100%.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица VII

Стабильность высушенных распылением твердых композиций рчГР
в метиленхлориде и этилацетате

Рецептура	% Извлече- ние ^a (в це- лом)	% Извле- чение ^b (раство- ренный)	Растворенный белок		
			% Большие агрег.	% Димеры	% Мономер
Испытания с метиленхлоридом					
15 мг/мл рчГР 3,75 мг/мл тре- галозы	--	--	12,3	8,8	75,4
10 мг/мл рчГР 2,5 мг/мл тре- галозы 0,2% Твин [®] 20	56,5	65,2	1,9	13,3	78,1
10 мг/мл рчГР 2,5 мг/мл тре- галозы 0,2% ПЭГ (МВ 3350)	50,7	56,7	3,9	12,3	77,7

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица VII (продолжение)

Испытания с этилацетатом

10 мг/мл рЧГР 2,5 мг/мл тре- галазы 0,2% Твин [®] 20	III,7	I26,8	0,9	0,0	99,2
10 мг/мл рЧГР 2,5 мг/мл тре- галазы 0,2% ПЭГ (МВ 3350)	II4,3	I25,5	I,1	0,0	98,9
5,0 мг/мл рЧГР 1,25 мг/мл тре- галазы 0,2% Твин [®] 20	I06,8	II0,4	0,3	3,0	96,7

а Извлечение белка в целом определено как количество белка, экстрагированного в буфер после обработки в органическом растворителе, деленное на рассчитанное количество белка, добавленное к буферу для экстракции (0,02 мл x 5 мг/мл).

б Результаты SEC-HPLC для белка, экстрагированного в буфер после обработки органическим растворителем. Процент извлечения растворенного белка определяли как отношение концентраций из области общего пика образца и стандарта сравнения, умноженное на 100%. Концентрации рЧГР в контроле и в образце определяли по поглощению при 278 нм.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1

Таблица VIII

Стабильность высушенных распылением с замораживанием твердых композиций рчГР в метиленхлориде и этилацетате

Рецептура	% Извлечение ^а (общее)	% Извлечение ^б (растворенный)	Растворенный белок		
			% Большие агрегат.	% Димеры	% Мономер
Испытания с метиленхлоридом					
5 мг/мл рчГР 1,25 мг/мл трегалозы 0,2% Твин® 20	37,2	34,0	6,2	8,3	85,5
5 мг/мл рчГР 1,25 мг/мл трегалозы 0,2% ПЭГ (МВ 3350)	68,8	66,8	2,3	15,8	78,8
Испытания с этилацетатом					
5 мг/мл рчГР 1,25 мг/мл трегалозы 0,2% Твин® 20	94,6	117,7	0,5	0,9	98,7
5 мг/мл рчГР 1,25 мг/мл трегалозы 0,2% ПЭГ (МВ 3350)	97,7	104,7	0,6	0,0	99,4

а

Общее извлечение белка определяли как количество белка, экстрагированного в буфер после обработки в органическом растворителе, деленное на рассчитанное количество белка, добавленного к буферу для экстракции (0,02 мл x 5 мг/мл).

^б Результаты SEC-HPLC для белка, экстрагированного в буфер после обработки органическим растворителем.

RU 2143889 C1

RU 2143889 C1