

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091007 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.14

(51) Int. Cl. A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.13

(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ВРЕМЕНИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ВЫСУШЕННЫХ
РАСПЫЛЕНИЕМ БЕЛКОВЫХ СОСТАВОВ

(31) 1718888.9

(32) 2017.11.15

(33) GB

(86) PCT/EP2018/081058

(87) WO 2019/096776 2019.05.23

(71) Заявитель:
ЮСБ БИОФАРМА СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Бейтенс Мартен (GB), Массан Жан
Иво (BE)

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

(57) Данное изобретение относится к применению сочетания сахара и одной или более аминокислот для снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава.

202091007

A1

A1

202091007

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562473ЕА/042

СПОСОБ СНИЖЕНИЯ ВРЕМЕНИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ВЫСУШЕННЫХ РАСПЫЛЕНИЕМ БЕЛКОВЫХ СОСТАВОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение принадлежит к области высушенных распылением фармацевтических составов и способов их производства. Более конкретно, оно относится к способам, применению и процессам снижения времени восстановления высушенных распылением белковых составов для фармацевтического применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Жидкие инъекции моноклональных антител, такие как внутривенные, внутримышечные или подкожные инъекции, все еще являются наиболее предпочтительным способом введения, который может давать высокую системную концентрацию моноклональных антител для терапевтических целей (Wan et al. *Technologies* 9 (2), e141 - e146. (2012); Roberts, C. J., *Current Opinion in Biotechnology* 30, 211-217 (2014); Moroz, E. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* 101, 108-121 (2016)). Подкожные инъекции являются предпочтительным способом указанных выше опций, так как они позволяют самовведение пациентом, потенциально ограничивая вмешательство в повседневную жизнь пациента и общие затраты на лечение. Однако объем, который может вводиться подкожно в отсутствие специализированных устройств или ферментных способов, таких как усиленные гиалуронидазой системы подкожного вливания, очень ограничен, около 1,5-2 мл, что вынуждает вводить высоко концентрированные составы моноклональных антител (Wasserman, R. L., et al. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 130 (4), 951-957 (2012)). Следовательно, высокие концентрации моноклональных антител в этих составах повышают шансы белкового самовзаимодействия с сопутствующим риском необратимой агрегации, что приводит к снижению эффективности продукта и повышению риска иммуногенных реакций (Roberts, C. J., *Current Opinion in Biotechnology* 30, 211-217 (2014); Barnett et al. *Biophysical Chemistry* 207, 21-29 (2015); Mahler et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(9), 2909-2934 (2009)).

Составы моноклональных антител для подкожных инъекций часто высушивают, если их жидкая форма недостаточно стабильна, так как удаление воды существенно снижает конформационную стабильность белков и ограничивает транспорт низкомолекулярных реагентов, соответственно снижая скорость самовзаимодействия белков и механизмы разложения, тем самым улучшая стабильность (при хранении) состава (Cicerone, M. T., et al. *Soft Matter* 8, 2983-2991 (2012)). Различные механизмы и модели стабилизации белка в жидком состоянии, во время сушки и в твердом состоянии были предложены в течение нескольких лет.

Сушка белковых составов часто проводится лиофилизацией, так как при этом отсутствует риск высокотемпературного воздействия на белки. Однако основным

недостатком лиофилизации является количество стресса, возникающего как во время замораживания, так и во время сушки, потенциально вызывая частичную или полную потерю активности.

Сушка распылением белковых составов, однако, является быстрым, одностадийным, адаптируемым способом, дающим порошки, имеющие желаемую морфологию, плотность и сыпучесть порошка. Хотя при сушке распылением применяются относительно высокие температуры, воздействия тепла на белок является минимальным в результате экстрагирования тепла из капли во время выпаривания растворителя и краткосрочности процесса сушки распылением. Для снижения воздействия факторов стресса, таких как напряжение сдвига, воздействие поверхностей раздела воздух/жидкость или повышенная тепловая нагрузка при потере гидратной оболочки, и для дальнейшего повышения стабильности в твердом состоянии, применяют подходящие эксципиенты.

Высушенные распылением составы, однако, а также другие белковые составы в порошковой форме, должны быть восстановлены, обычно в воде, непосредственно перед введением. Хотя восстановление высушенных распылением составов может быть проведено легко, время, необходимое для его завершения, может широко варьироваться в зависимости от эксципиентов, добавленных к белковому составу до сушки распылением.

Значительные исследования были проведены для определения влияния этих эксципиентов на стабильность белка, и в основном они сфокусированы на лиофилизации или сушке распылением для ингаляций, а не на порошках для подкожного введения. Более того, очень немного известно о подходящих эксципиентах, которые могут повлиять на время восстановления для высушенных распылением белковых составов.

Поэтому существует необходимость в данной области техники с получении других улучшенных белковых составов для подкожных инъекций, которые после сушки распылением восстанавливаются в течение приемлемого периода времени.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к выявленной выше потребности в получении способов, процессов и применений для снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава через сочетание сахара и одной или более аминокислот.

Следующие конкретные варианты описаны ниже как пронумерованные:

Вариант 1: Способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, где способ включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок, в присутствии сахара и одной или более аминокислот, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислот присутствует в количестве от около 50 мМ до 200 мМ.

Вариант 2: Способ по варианту 1, где белком является антитело или его фрагмент.

Вариант 3: Способ по варианту 1 или варианту 2, где сахаром является сахароза, трегалоза или их смесь.

Вариант 4: Способ по одному или более из представленных выше вариантов, где

одной или несколько аминокислотами являются глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-серин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин или их смеси.

Вариант 5: Способ по одному или более из представленных выше вариантов, где сахаром является сахароза или трегалоза и аминокислотой является гидрохлорид L-аргинина, гидрохлорид L-гистидина, гидрохлорид L-лизина или их смеси.

Вариант 6: Способ по одному или более из представленных выше вариантов, где способ содержит сушку распылением белкового состава, дополнительно содержащего поверхностно-активное вещество.

Вариант 7: Способ по варианту 6, где поверхностно-активным веществом является полисорбат, предпочтительно, полисорбат 20.

Вариант 8: Способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, включающий стадии:

- a. получения белкового состава, содержащего белок, сахар и одну или более аминокислот;
- b. сушку распылением белкового состава, полученного на стадии a);
- c. выделение высушенного распылением белкового состава со стадии b);
- d. восстановление, предпочтительно водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахара и одной или более аминокислот, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислота присутствует в количестве от около 50 мМ до 200 мМ.

Вариант 9: Способ по варианту 8, где белком является антитело или его фрагмент.

Вариант 10: Способ по вариантам 8 или 9, где сахаром является сахароза, трегалоза или их смесь.

Вариант 11: Способ по любому из вариантов 8-10, где аминокислотой является глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-серин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин, L-глутамат, L-аспартат, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин или их смеси.

Вариант 12: Способ по любому из вариантов 8-11, где сахаром является сахароза или трегалоза, и аминокислотой является гидрохлорид L-аргинина, гидрохлорид L-гистидина, гидрохлорид L-лизина или их смеси.

Вариант 13: Способ по любому из вариантов 8-12, где способ включает сушку распылением белкового состава, дополнительно содержащего поверхностно-активное вещество.

Вариант 14: Способ по варианту 13, где поверхностно-активным веществом является полисорбат, предпочтительно, полисорбат 20.

Вариант 15: Белковый состав, полученный способом по любому из вариантов 8-14.

Вариант 16: Белковый состав по Варианту 15 для применения в терапии или диагностике.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Время восстановления для составов, содержащих сахар и сочетания аминокислот. Действие сочетания аминокислот сравнивают с только 2,5% сахарозой.

Фигура 2. Расширенный график оценки значения параметра высушенных распылением составов от DoE. Модель рассчитывают с применением измеренных значений ($n=3$) для образцов, хранящихся при 5°C. Белые столбики означают незначительные параметры, а параметры, которые статистически значимы на уровне 0,05 обозначены темными столбиками. «Усы» означают стандартное отклонение ошибки для каждого из оцениваемых параметров. Оценка отсекаемого отрезка = $18,69 \pm 0,45$ (CO) минут.

Фигура 3. Время восстановления высушенных распылением составов, содержащих mAb1. Сравнение времени восстановления для составов, содержащих выбранные аминокислоты и сахарозу и поверхностно-активное вещество (темные столбики) и только поверхностно-активное вещество (белые столбики).

Фигура 4. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1. Только сахароза против сахарозы и одной или сочетания аминокислот. Поверхностно-активное вещество отсутствует.

Фигура 5. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1. Только сахароза и поверхностно-активное вещество против сахарозы, поверхностно-активного вещества и одной или сочетания аминокислот.

Фигура 6. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1. Только трегалоза против сахарозы и одной или сочетания аминокислот. Поверхностно-активное вещество отсутствует.

Фигура 7. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1. Только трегалоза и поверхностно-активное вещество против сахарозы, поверхностно-активного вещества и одной или сочетания аминокислот.

Фигура 8. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего Fab'-ПЭГ антитело. Влияние на время восстановления состава Fab'-ПЭГ антитела только с сахарозой против сахарозы в сочетании с повышенной концентрацией глицина.

Фигура 9. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего Fab'-ПЭГ антитело. Действие на время восстановления состава Fab'-ПЭГ антитела с различными аминокислотами при 1% в сочетании с 2,5% сахарозой.

Фигура 10. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1, дисахарид и Аргинин. А) Действие трегалозы независимо от концентрации Аргинина. В) Действие Аргинина независимо от концентрации трегалозы. С) Действие суммарного количества Аргинина и трегалозы.

Фигура 11. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1, дисахарид и Глицин. А) Действие трегалоз независимо от концентрации Глицина. В) Действие Глицина независимо от концентрации трегалозы. С) Действие суммарного количества Глицина и трегалозы.

Фигура 12. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1, дисахарид и Лизин. А) Действие трегалозы независимо от концентрации Лизина. В) Действие Лизина независимо от концентрации трегалозы. С) Действие суммарного количества Лизина и трегалозы.

Фигура 13. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb1, дисахарид и Пролин. А) Действие трегалозы независимо от концентрации Пролина. В) Действие Пролина независимо от концентрации трегалозы. С) Действие суммарного количества Пролина и трегалозы.

Фигура 14. Время восстановления высушенного распылением состава, содержащего mAb2. Действие на время восстановления составов mAb2 с различными аминокислотами при 100 мМ в сочетании с 2,5% трегалозой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава в присутствии сахара и одной или более аминокислот.

Было описано, что дисахариды и аминокислоты, такие как L-аргинин, стабилизируют белок во время лиофилизации и в твердом состоянии (Ohtake et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (13), 1053-1073 (2011); Kamerzell et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (13), 1118-1159 (2011) and Balcão and Vila, *Advanced Drug Delivery Reviews* 93, 25-41 (2015)). Однако не было проведено исследований относительно эксципиентов и способов, которые могли бы снижать время восстановления высушенного распылением белкового состава, содержащего белок, как описано здесь.

Поэтому данное изобретение также представлено для применения сочетания одной или более аминокислот и сахара, такого как дисахарид, предпочтительно, сахарозы или трегалозы или их смеси, для снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава.

В другом аспекте, в данном изобретении также представлен способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, включающий стадии:

- a. получения белкового состава, содержащего белок, сахар и одну или более аминокислот;
- b. сушку распылением белкового состава, полученного на стадии a);
- c. выделение высушенного распылением белкового состава со стадии b);
- d. восстановление, предпочтительно водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахара и одной или более аминокислот.

Термин “в присутствии” в данном описании означает, что сахар и одна или более аминокислот являются частью белкового состава до сушки распылением этого состава, и подразумевает отсутствие ограничений в том, как и когда они добавляются или в порядке

добавления, при условии, что белковый состав до сушки распылением содержит их.

Приемлемым временем восстановления считается период в пределах 30 минут, предпочтительно, в пределах 25 минут, или более предпочтительно, в пределах 20 минут или ранее. Термин "время восстановления" в данном описании означает время, которое требуется для восстановления высушенного распылением белкового состава в желаемом объеме растворителя (например, воды). В данном описании, при рассмотрении того, являются ли определенные эксципиенты неожиданно превосходящими другие, сравнивают время восстановления для идентично высушенных распылением белковых составов, но для разных исследуемых эксципиентов. Неожиданно превосходные эксципиенты снижают время восстановления в этих пределах на, по крайней мере, около 10% или более.

Предпочтительно, белком в белковом составе в соответствии со способом, применением и процессом в соответствии с данным изобретением, является антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

Термин "антитело" или "антитела" в данном описании относится к моноклональным или поликлональным антителам и не ограничен рекомбинантными антителами, которые созданы рекомбинантными методами, известными в данной области техники.

Предпочтительно, антителом, содержащимся в белковом составе в соответствии со способом, применением и процессом в соответствии с данным изобретением, является моноклональное антитело.

"Антитело" или "антитела" включают антитела' любых видов, в частности, млекопитающих, имеющие две по существу полные тяжелые и две по существу полные легкие цепи, человеческие антитела любого изотипа, включая IgA₁, IgA₂, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgG₄ IgE и IgM и их модифицированные варианты, антитела не человекообразных приматов, например, от шимпанзе, бабуина, резуса или яванского макака, антитела грызунов, например, от мыши, крысы или кролика; козью или лошадиные антитела и их производные, или птичьи антитела, такие как куриные антитела или рыбы, такие как акулы антитела. Термин "антитело" или "антитела" также относится к "химерным" антителам, в которых первая часть, по крайней мере, одной тяжелой и/или легкой цепи последовательности антитела получена из первого вида, и вторая часть одной тяжелой и/или легкой цепи последовательности антитела получена из второго вида. Рассматриваемые химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие антиген-связывающие последовательности переменного домена, полученные из не человекообразных приматов (например, мармышковых, таких как бабуин, резус или Яванский макак) и последовательности человеческого постоянного домена. "Гуманизированные" антитела являются химерными антителами, которые содержат последовательно, полученную из не человеческих антител. По большей части, гуманизированными антителами являются человеческие антитела (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены

остатками из гипервариабельной области или определяющей комплементарность области (ОКО) не человеческих видов (донорное антитело), таких как мышь, кролик, курица или не человекообразный примат, имеющие желаемую специфичность, аффинность и активность. В большинстве случаев остатки человеческого (реципиентного) антитела находятся вне ОКО; т.е. в каркасной области (КО), дополнительно заменены соответствующими не человеческими остатками. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не найдены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации делают для дополнительного улучшения эффективности антитела. Гуманизация снижает иммуногенность не человеческих антител у человека, тем самым способствуя применению антител для лечения человеческих болезней. Гуманизированные антитела и несколько различных технологий их создания хорошо известны в данной области техники. Термин "антитело" или "антитела" также относится к человеческим антителам, которые могут быть созданы в качестве альтернативы гуманизации. Например, возможно получать трансгенных животных (например, мышей), которые способны, при иммунизации, вырабатывать полный спектр человеческих антител в отсутствие образования эндогенных мышинных антител. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена стыковой области (СО) тяжелой цепи антитела у химерных и герминальных мутированных мышей дает полное ингибирование образования эндогенного антитела. Перенос генетического типа человеческого герминального иммуноглобулина у таких герминальных мутированных мышей дает образование человеческих антител со специфичностью против конкретного антигена при иммунизации трансгенного животного, несущего гены человеческого герминального иммуноглобулина с указанным антигеном. Методы получения таких трансгенных животных и методы выделения и получения человеческих антител от таких трансгенных животных известны в данной области техники. Альтернативно, у трансгенного животного; например, мыши, только гены иммуноглобулина, кодирующие для переменных областей мышинового антитела, замещены соответствующими последовательностями гена человеческого переменного иммуноглобулина. Гены мышинового герминального иммуноглобулина, кодирующие постоянные области антитела, остаются неизменными. Таким образом, эффекторные функции антитела в иммунной системе трансгенной мыши и, следовательно, развитие В клетки по существу неизменны, что может привести к улучшенной реакции антитела при антигенной стимуляции *in vivo*. Как только гены, кодирующие конкретное рассматриваемое антитело были выделены у таких трансгенных животных, гены, кодирующие постоянные области могут быть замещены генами человеческой постоянной области для получения полностью человеческого антитела. Термин "антитело" или "антитела" в данном описании также относится к гликозилированному антителу.

Термин "его фрагмент" или его грамматические варианты в данном описании относятся к фрагменту антитела. Фрагмент антитела содержит, по крайней мере, одну тяжелую или легкую цепь домена иммуноглобулина, как известно в данной области техники, и связан с одним или более антигеном(ами). Примеры фрагментов антитела в

соответствии с данным изобретением включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv и scFv фрагменты; а также диатела, триатела, тетратела, минитела, доменные антитела (dAbs), такие как sdAbs, VHH или верблюдовые антитела (например, от верблюдов или лам, такие как Nanobodies™) и VNAR фрагменты, одноцепочечные антитела, биспецифические, триспецифические, тетраспецифические или мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела или антител, включающие, но не ограниченные ими, Fab-Fv или Fab-Fv-Fv конструкторы. Фрагменты антитела, определенные выше, известны в данной области техники.

При желании антитело или антиген-связывающий фрагмент может быть конъюгировано с одной или более эффекторными молекулами. Должно быть понятно, что эффекторная молекула может содержать одну эффекторную молекулу или две или более таких молекулы связанные так, чтобы образовывать одну группу, которая может быть присоединена к антителам в соответствии с данным изобретением. Если желательно получить фрагмент антитела, связанный с эффекторной молекулой, его можно получить стандартными химическими или рекомбинантными ДНК методами, в которых фрагмент антитела связан, прямо или через сочетающийся агент, с эффекторной молекулой. Методики конъюгирования таких эффекторных молекул с антителами хорошо известны в данной области техники (см. Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *ImMunol. Rev.*, 62:119-58 и Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Конкретные химические методы включают, например, описанные в WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 и WO 03/031581. Альтернативно, когда эффекторная молекула является белком или полипептидом, связь может быть достигнута с применением методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в WO 86/01533 и EP0392745.

Термин эффекторная молекула в данном описании включают, например, антинеопластический агент, лекарственные средства, токсины, биологически-активные белки, например, ферменты, другое антитело или фрагменты антитела, антиген-связывающие агенты, синтетически (включая ПЭГ) или природные полимеры, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, например, ДНК, РНК и их фрагменты, радионуклиды, в частности, радиоидид, радиоизотопы, хелатированные металлы, наночастицы и репортерные группы, такие как флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть определены ЯМР или ЭПР спектроскопией.

Эффекторная молекула может повышать период полураспада антитела *in vivo*, и/или снизить иммуногенность антитела и/или повысить доставку антитела через эпителиальный барьер в иммунную систему. Примеры подходящих эффекторных молекул такого типа включают полимеры, альбумин, альбумин-связывающие белки или альбумин-связывающие соединения, такие как описаны в WO05/117984.

Когда эффекторной молекулой является полимер, она может, в общем, быть синтетическим или природным полимером, например, необязательно замещенным прямым или разветвленным полиалкиленовым, полиалкениленовым или

полиоксипропиленовым полимером или разветвленным или не разветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Определенные необязательные заместители, которые могут присутствовать на указанных выше синтетических полимерах, включают одну или более гидроксильную, метильную или метоксигруппу.

Конкретные примеры синтетических полимеров включают необязательно замещенные прямые или разветвленные поли(этиленгликоль), поли(пропиленгликоль) поли(виниловый спирт) или их производные, особенно необязательно замещенный поли(этиленгликоль), такой как метоксиполи(этиленгликоль) или его производные.

Конкретные природные полимеры включают лактозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В одном варианте, полимером является альбумин или его фрагмент, такой как альбумин человеческой сыворотки или его фрагмент. В другом варианте, полимером является молекула ПЭГ.

Размер природного или синтетического полимера может варьироваться по желанию, но обычно составляет среднюю молекулярную массу от 500 Да до 50000 Да, например, от 5000 до 40000 Да, например, от 20000 до 40000 Да. Размер полимера, в частности, может быть выбран на основе предполагаемого применения продукта, например, способности локализоваться в определенных тканях, таких как опухоли, или продлевать период полувыведения из кровотока (обзор см. в Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Таким образом, например, если продукт предназначен для того, чтобы покинуть кровоток и проникнуть в ткани, например, для применения в лечении опухоли, может быть предпочтительно применять низкомолекулярный полимер, например, с молекулярной массой около 5000 Да. Для применений, при которых продукт остается в кровотоке, может быть предпочтительно применять высокомолекулярный полимер, например, имеющий молекулярную массу в интервале от 20000 Да до 40000 Да.

Подходящие полимеры включают полиалкиленовый полимер, такой как поли(этиленгликоль) или, особенно, метоксиполи(этиленгликоль) или его производное, и особенно с молекулярной массой в интервале от около 15000 Да до около 40000 Да.

В одном примере, антитела для применения в соответствии с данным изобретением присоединяют к группам поли(этиленгликоля) (ПЭГ). В одном конкретном примере, антителом является фрагмент антитела, и ПЭГ молекулы могут быть присоединены через любую доступную боковую цепь аминокислоты или концевую функциональную группу аминокислоты, расположенную в фрагменте антитела, например, любую свободную амино-, имино-, тиольную, гидроксильную или карбоксильную группу. Такие аминокислоты могут существовать естественным образом в фрагменте антитела или могут быть встроены в фрагмент с применением рекомбинантных ДНК методов (см., например, US 5,219,996; US 5,667,425; WO98/25971, WO2008/038024). В одном примере, молекула антитела в соответствии с данным изобретением является модифицированным Fab фрагментом, где модификацией является добавление С-концевой области и его

тяжелой цепи одной или более аминокислот, позволяющей присоединить эффекторную молекулу. Подходящим образом, дополнительные аминокислоты образуют модифицированную шарнирную область, содержащую один или более цистеиновых остатков, к которым может быть присоединена эффекторная молекула. Множество сайтов могут применяться для присоединения двух или более ПЭГ молекул.

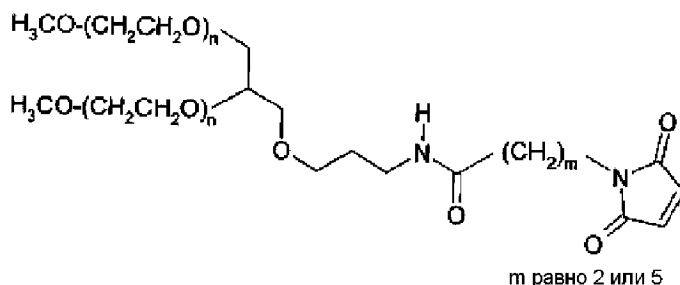
Подходящим образом ПЭГ молекулы ковалентно связаны через тиольную группу, по крайней мере, одного цистеинового остатка, расположенного в фрагменте антитела. Каждая молекула полимера, присоединенная к модифицированному фрагменту антитела, может быть ковалентно связана с атомом серы цистеинового остатка, расположенного в фрагменте. Ковалентная связь обычно является дисульфидной связью или, в частности, связью сера-углерод. Если тиольную группу используют в качестве точки присоединения соответствующим образом активированных эффекторных молекул, могут применяться, например, селективные к тиолу производные, такие как малеимиды и производные цистеина. Активированный полимер может применяться в качестве исходного материала при получении полимер-модифицированных фрагментов антител, как описано выше.

Активированным полимером может быть любой полимер, содержащий тиольную реакционноспособную группу, такую как α -галокарбоновая кислота или сложный эфир, например, йодацетамид, имид, например, малеимид, винилсульфон или дисульфид. Такие исходные материалы могут быть получены коммерчески (например, от Nektar, ранее Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) или могут быть получены из коммерчески доступных исходных материалов с применением обычных химических методов. Конкретные ПЭГ молекулы включают 20K метокси-ПЭГ-амин (получаемый от Nektar, ранее Shearwater; Rapp Polymere; и SunBio) и М-ПЭГ-SPA (получаемый от Nektar, ранее Shearwater).

В одном варианте, антителом является модифицированный Fab фрагмент, Fab' фрагмент или diFab, который ПЭГилирован, т.е. имеет ПЭГ (поли(этиленгликоль)), ковалентно присоединенный к нему, например, способом, описанным в EP 0948544 или EP1090037 [см. также "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. В одном примере ПЭГ присоединяют к цистеину в шарнирной области. В одном примере, ПЭГ модифицированный Fab фрагмент имеет малеимидную группу, ковалентно связанную с одной тиольной группой в модифицированной шарнирной области. Лизиновый остаток может быть ковалентно связан с малеимидной группой, и к любой из аминовых групп на лизиновом остатке может быть присоединен метоксиполи(этиленгликолевый) полимер, имеющий молекулярную массу приблизительно 20000 Да. Общая молекулярная масса ПЭГ, присоединенного к Fab фрагменту, поэтому может быть приблизительно 40000 Да.

Конкретные ПЭГ молекулы включают 2-[3-(N-малеимидо)пропионамидо]этиламин N, N'-бис(метоксиполи(этиленгликоля) ММ 20000) модифицированный лизин, также известный как ПЭГ2MAL40K (получаемый от Nektar, ранее Shearwater).

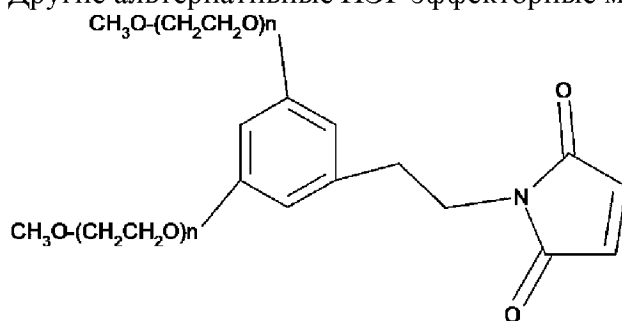
Альтернативные источники ПЭГ линкеров включают NOF, который дает GL2-400MA3 (где m в структуре ниже 5) и GL2-400MA (где m равен 2) и n приблизительно равен 450:



То есть каждый ПЭГ составляет около 20000 Да.

Таким образом, в одном варианте, ПЭГ является 2,3-бис(метилполиоксиэтиленокси)-1-[[3-(6-малеимидо-1-оксогексил)амино]пропилокси}гексаном (2-плечевой разветвленный ПЭГ, -CH₂) 3NHCO(CH₂)₅-MAL, ММ 40000, известный как SUNBRIGHT GL2-400MA3.

Другие альтернативные ПЭГ эффекторные молекулы следующего типа:



доступны от Dr Reddy, NOF и Jenkem.

В одном варианте представлено антитело в соответствии с данным изобретением, которое ПЭГилировано (например, ПЭГ, описанным здесь), присоединено через цистеиновый аминокислотный остаток на или около аминокислоты 226 в цепи, например, аминокислоты 226 тяжелой цепи (последовательным нумерованием).

В одном варианте в данном описании представлена Fab'-ПЭГ молекула, содержащая один или более ПЭГ полимеров, например, 1 или 2 полимера, таких как 40 кДа полимер или полимеры. Fab'-ПЭГ молекулы в соответствии с данным изобретением могут быть особенно полезны в том, что они имеют период полураспада, независимый от Fc фрагмента. В одном примере, в данном изобретении представлен способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, где способ включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии сахара и одной или более аминокислот, где белком является Fab' фрагмент, конъюгированный с полимером, таким как ПЭГ. В другом варианте данного изобретения, представлен способ снижения времени восстановления высушенного распылением

белкового состава, включающий стадии:

- a. получения белкового состава, содержащего белок, сахар и одну или более аминокислот;
- b. сушку распылением белкового состава, полученного на стадии a);
- c. выделение высушенного распылением белкового состава со стадии b);
- d. восстановление, предпочтительно водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT_1 ;

где время восстановления RT_1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахара и одного или более аминокислот, и где белком является Fab' фрагмент, конъюгированный с полимером, таким как ПЭГ, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислот присутствуют в количестве от около 50 мМ до 200 мМ.

Антитело или его фрагмент, содержащееся в белковом составе в соответствии со способами, применениями и процессами в соответствии с данным изобретением, предпочтительно является человеческим или гуманизированным моноклональным антителом, предпочтительно, гуманизированным моноклональным полноразмерным антителом.

Молекулы антитела обычно могут быть получены культивированием клеток хозяина, содержащих вектор, кодирующий последовательность антитела, в условиях, подходящих для экспрессии белка из ДНК, кодирующей молекулу антитела в соответствии с данным изобретением, и выделением молекулы антитела.

Молекула антитела может содержать полипептид с только тяжелой или легкой цепью, в этом случае последовательность, кодирующую полипептид с только тяжелой или легкой цепью, необходимо применять для трансфицирования клеток хозяина. Для производства продуктов, содержащих тяжелые и легкие цепи, колония клеток может быть трансфицирована двумя векторами, где первый вектор кодирует полипептид с легкой цепью, а второй вектор кодирует полипептид с тяжелой цепью. Альтернативно, может применяться один вектор, где вектор включает последовательности, кодирующие полипептиды с легкой цепью и тяжелой цепью.

Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое может быть произведено в промышленных масштабах, может быть получено культивированием эукариотов хозяина, трансфицированных одним или более векторами экспрессии, кодирующими рекомбинантный фрагмент антитела. Эукариоты хозяина предпочтительно являются клетками млекопитающих, более предпочтительно, клетками яичников Китайского хомяка.

Клетки млекопитающих могут быть культивированы в любой среде, которая будет поддерживать их рост и экспрессию рекомбинантного белка, предпочтительно, средой является химически определенная среда, которая не содержит полученные у животных продукты, такие как сыворотка и пептон животных. Существуют разные клеточные культуральные среды, доступные специалистам в данной области техники, содержащие

различные сочетания витаминов, аминокислот, гормонов, факторов роста, ионов, буферов, нуклеозидов, глюкозы или эквивалентного источника энергии, присутствующие в подходящих концентрациях для обеспечения роста клеток и образования белка. Дополнительные компоненты клеточной культуральной среды могут быть включены в клеточную культуральную среду в подходящих концентрациях в различные моменты времени во время цикла культивирования клеток, которые будут известны специалисту в данной области техники.

Клеточная культура млекопитающих может находиться в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, которые могут работать или не могут работать в режиме периодического культивирования с подпиткой в требуемом масштабе производства. Эти биореакторы могут быть ректорами с механическим перемешиванием или реакторами с пневмоподъемниками. Различные крупномасштабные биореакторы доступны с емкостью более 1000 л - 50000 л, предпочтительно, от 5000 л и 20000 л, или до 10000 л. Альтернативно, биореакторы меньшего масштаба, такие как от 2 л до 100 л, также могут применяться для производства антитела или фрагмента антитела.

Антитело или его антиген-связывающий фрагмент обычно находят в надосадочной жидкости культуры клеток млекопитающего хозяина, обычно культуры клеток СНО. Для способов культивирования СНО, в которых рассматриваемый белок, такой как антитело или его антиген-связывающий фрагмент, секретируется в надосадочной жидкости, указанную надосадочную жидкость собирают способами, известными в данной области техники, обычно центрифугированием.

Альтернативно, клетки хозяина являются прокариотами, предпочтительно, грамотрицательными бактериями. Более предпочтительно, клетками хозяина являются клетки *E. coli*. Прокариоты хозяина для экспрессии белка хорошо известны в данной области техники (Terpe, K. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 211-222 (2006)). Клетки хозяина являются рекомбинантными клетками, которые генетически сконструированы для получения рассматриваемого белка, такого как антиген-связывающий фрагмент антитела. Рекомбинантные клетки хозяина *E. coli* могут быть получены из любого подходящего штамма *E. coli*, включая MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5 α , DH1, BL21, K12, XL1Blue и JM109. Одним из примеров является штамм *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), широко применяемый штамм хозяина для ферментация рекомбинантного белка. Фрагменты антител также могут быть получены культивированием модифицированных штаммов *E. coli*, например, метаболических мутантов или протеаза-дефицитных штаммов *E. coli*.

Фрагмент антитела обычно находится либо в периплазме клеток хозяина *E. coli*, либо в надосадочной жидкости клеточной культуры, в зависимости от природы белка, объема получения и применяемого штамма *E. coli*. Способы нацеливания белков на эти компартменты хорошо известны в данной области техники (Makrides, S.C.; *Microbiol Rev* 60, 512-538 (1996)). Примеры подходящих сигнальных последовательностей для направления белков на периплазму *E. coli* включают *E. coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB и OmpF сигнальные последовательности. Белки могут быть нацелены на надосадочную

жидкость, полагаясь на естественные секреторные пути, или вызывая ограниченную протечку внешней мембраны для того, чтобы вызвать секрецию белка, примерами чего являются применение *relB* лидера, лидера белка *A*, коэкспрессия белка, выделяющего бактериоцин, митомицин-индуцированного белка, выделяющего бактериоцин, вместе с добавлением глицина в культуральную среду, и коэкспрессия гена *kil* для пермеабиллизации мембраны. Наиболее предпочтительно, рекомбинантный белок экспрессируется в периплазме хозяина *E. coli*.

Экспрессия рекомбинантного белка в клетках хозяина *E. coli* также может происходить под контролем индуцируемой системы, где экспрессия рекомбинантного антитела в *E. coli* находится под контролем индуцируемого промотора. Множество индуцируемых промоторов, подходящих для применения в *E. coli*, хорошо известно в данной области техники, и в зависимости от промотора, экспрессия рекомбинантного белка может быть вызвана изменяющимися факторами, такими как температура или концентрация конкретного вещества в среде для выращивания. Примеры индуцируемых промоторов включают *E.coli lac*, *tac* и *trc* промоторы, которые индуцируются лактозой или не гидролизуемым аналогом лактозы, изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) и *rhoA*, *trp* и *araBAD* промоторами, которые индуцируются фосфатом, триптофаном и L-арабинозой, соответственно. Экспрессия может быть вызвана, например, добавлением индуктора или изменением температуры, если индукция зависит от температуры. Если индукция экспрессии рекомбинантного белка достигается добавлением индуктора в культуру, индуктор может быть добавлен любым подходящим способом, в зависимости от системы ферментации и индуктора, например, одним или несколькими впрыскиваниями или постепенным добавлением индуктора через сырье. Должно быть понятно, что могут быть задержки между добавлением индуктора и действительной индукцией экспрессии белка, например, если индуктором является лактоза, может быть задержка начала экспрессии белка, хотя любой ранее присутствующий источник углерода используется до лактозы.

Культуры клеток хозяина *E. coli* (ферментации) могут быть культивированы в любой среде, которая поддерживает рост *E. coli* и экспрессию рекомбинантного белка. Средой может быть любая химически определенная среда, такая как, например, описана в Durany O, et al. (2004) (Process Biochem 39, 1677-1684).

Культивирование клеток хозяина *E. coli* может происходить в любом подходящем контейнере, таком как встряхиваемая колба или биореактор, в зависимости от требуемого масштаба производства. Доступны различные крупномасштабные биореакторы емкостью от более чем 1000 литров до около 100000 литров. Предпочтительно, применяют биореакторы от 1000 до 50000 литров, более предпочтительно от 1000 до 25000, 20000, 15000, 12000 или 10000 литров. Также могут применяться биореакторы меньшего масштаба с емкостью от 0,5 до 1000 литров.

Ферментация *E. coli* может проводиться в любой подходящей системе, например, непрерывной, периодической или подпитываемой, в зависимости от белка и требуемого

выхода. Периодический режим может применяться с впрысками питательных веществ или индукторов, при необходимости. Альтернативно, может применяться культура с подпиткой, и культуры выращивают в периодическом режиме пред-индукции при максимальной удельной скорости роста, которая может поддерживаться с использованием питательных веществ, изначально присутствующих в биореакторе, и одного или более режимов подачи питательных веществ, используемых для контроля скорости роста до завершения ферментации. Подпитываемый режим также может применяться до индукции для контроля метаболизма клеток хозяина *E. coli* и для достижения большей плотности клеток.

При желании, клетки хозяина могут быть подвергнуты сбору из ферментационной среды, например, клетки хозяина могут быть собраны из образца центрифугированием, фильтрацией или концентрацией. В таком случае способ обычно включает стадию центрифугирования и восстановления клеток до экстрагирования белка.

Для процессов ферментации *E. coli*, в которых рассматриваемый белок, такой как антитело или антиген-связывающий фрагмент антитела, находится в периплазматическом пространстве клетки хозяина, требуется выделять белок из клетки хозяина. Выделение может быть достигнуто любым подходящим способом, таким как клеточный лизис механической или автоклавной обработкой, замораживанием-оттаиванием, осмотическим шоком, агентами экстракции или тепловой обработкой. Такие способы экстракции для выделения белка хорошо известны в данной области техники. Поэтому, в конкретном варианте, способы получения включают дополнительную стадию экстракции белка до очистки белка.

Другие способы получения антиген-связывающего фрагмента человеческого антитела *in vitro* основаны на технологиях отображения, таких как технология фагового дисплея или рибосомного дисплея, где используют библиотеки рекомбинантной ДНК, которые генерируются либо из, по крайней мере, частично искусственно, либо из иммуноглобулинового варибельного (V) домена генного репертуара доноров. Технологии фагового и рибосомного дисплея для создания человеческого антитела хорошо известны в данной области техники. Человеческие антитела также могут быть созданы из выделенных человеческих В клеток, которые *ex vivo* иммунизируют с рассматриваемым антигеном и затем сливают с получением гибридом, которые затем могут быть проверены на оптимальное человеческое антитело.

Способ, применение и процесс снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава.

Способ сушки распылением включает выпаривание влаги после распыления жидкого сырья на мелкие капли с получением высушенного порошка. Состоящая из трех основных стадий, сушка распылением начинается с диспергирования жидкого сырья в распыляемый газ (сжатый воздух или N₂, 5-8 бар) пневмораспылителем. Мелкие капли распыляют через форсунку (распыление). Затем капли суспендируют в высушивающей среде, обычно состоящей из нагретого параллельного потока воздуха, позволяя испарение

и перенос жидкости. На конечной стадии, высушенные твердые вещества отделяют от потока воздуха в центрифуге. Высушенный порошок собирают, и воздух выпускают в атмосферу.

Примеры сушки распылением белкового состава описаны в примерах ниже.

Антитело или его фрагмент, содержащееся в белковом составе в соответствии с данным изобретением, совокупно может присутствовать в любой концентрации, например, от 1 до 200 мл/мл, предпочтительно, от 20 до 150 мл/мл, даже предпочтительно, от 30 до 100 мл/мл, например, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мл/мл. Альтернативно, одна или более аминокислот предпочтительно присутствует в белковом составе, высушенном распылением, в количестве, выраженном в массе на 100 мл (% масс./об.). В этом случае антитело или его фрагмент, содержащееся в белковом составе в соответствии с данным изобретением, совокупно, может присутствовать в количестве от 0,1 до 20% масс./об., предпочтительно, от 2,0 до 15% масс./об., или даже более предпочтительно, от 3,0 до 10% масс./об., например, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10% масс./об.

Снижение времени восстановления белкового состава, который высушен распылением, достигается введением до сушки распыления сахара и одной или более аминокислот.

В контексте этого изобретения в целом, сахар, предпочтительно, выбирают из дисахарида, более предпочтительно, сахарозы, трегалозы или их смеси. Сахар предпочтительно присутствует в белковом составе для сушки распылением в количестве 1,0% до 20% масс./об., или от 1,5% до 15% масс./об. или от 1,5% до 10% масс./об. или от 1,5% до 4,5% масс./об., например, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 4,0, 4,1, 4,2 или 4,5% масс./об., или даже более предпочтительно, от 2,5% до 4,2% масс./об., например, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 или 4,2% масс./об. Альтернативно, сахар предпочтительно присутствует в белковом составе для сушки распылением в количестве, выраженном в молях. В таком случае, сахар предпочтительно присутствует в белковом составе для сушки распылением в количестве от 30 до 600 мМ, или от 45 до 135 мМ, например, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120 или 135 мМ, или даже, предпочтительно, от 70 мМ до 125 мМ, например, 70, 73, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 или 125 мМ. Сахароза или трегалоза являются одинаково эффективным сахаром для достижения технического действия в соответствии с данным изобретением, и их индивидуальное присутствие в смеси предпочтительно.

В контексте данного изобретения, в целом, одна или более аминокислот могут присутствовать в D- и/или L- форме, но обычно в L-форме. Одной или более аминокислотой предпочтительно является глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-серин, L-треонин, L-глутамин, L-ампарагин, L-глутамат, L-аспартат, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин или их смеси. Хотя и без ограничений, предпочтительно включение основной аминокислоты, т.е. аргинина, лизина и/или гистидина или их смесей. Аминокислота

может присутствовать в виде любой подходящей соли, например, гидрохлорида, например, в виде аргинина-HCl, лизина-HCl или гистидина-HCl. Одна или более аминокислота предпочтительно присутствует в белковом составе для сушки распылением в количестве от или выше 10мМ до 250мМ, предпочтительно, от или выше 50 мМ до 200 мМ или от или выше 50 мМ до 150 мМ, например, 50, 51, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мМ. Альтернативно, одна или более аминокислот предпочтительно присутствуют в белковом составе для сушки распылением в количестве, выраженном как масса на 100 мл (% масс./об.). Например, если, по крайней мере, одной аминокислотой будет являться аргинин-HCl (имеющий ММ 210,66 Да), указанный аргинин-HCl будет присутствовать в количестве от или выше 0,2 до 5,25% масс./об. или от или выше 1,06 до 4,2% масс./об., предпочтительно, от или выше 1,06 до 3,2% масс./об., например, 1,1, 1,15, 1,2, 1,5, 2,0, 2,2, 2,5, 3,0 или 3,2% масс./об. В другом примере, если, по крайней мере, одной аминокислотой является лизин-HCl (имеющий ММ 182,65 Да), указанный лизин-HCl будет присутствовать в количестве от или выше 0,1 до 4,5% масс./об. или от или выше 0,9 до 3,6% масс./об., предпочтительно, от или выше 0,9 до 2,7% масс./об., например, 0,9, 0,95, 1,0, 1,5, 1,8, 2,0, 2,5 или 2,7% масс./об. В компетенции специалиста в данной области техники находится превращение рассматриваемой молярности в % масс./об. для любой аминокислоты.

В контексте этого изобретения в целом, молярность сахара и одной из одной или более аминокислот может быть суммирована. В этом случае, сахар и одна или более аминокислот предпочтительно присутствуют в белковом составе для сушки распылением в суммарной молярности (также альтернативно обозначенной как суммарное количество) от или выше 60 мМ до 400 мМ, предпочтительно, от или выше 70 мМ до 300 мМ или от или выше 70мМ до 260 мМ, например, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или 260 мМ.

В одном варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок, в присутствии сахарозы или трегалозы или их смеси и одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгируют с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

- a. получения белкового состава, содержащего белок, сахарозу или трегалозу или их смеси и одну или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей;
- b. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии a);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии b);

d. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT_1 ;

где время восстановления RT_1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислот присутствует в количестве от или выше 50 мМ до 200 мМ. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

a. получения белкового состава, содержащего белок, от 1% до 20% сахарозы или трегалозы или их смеси и от или выше 50 мМ до 250 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей;

b. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии a);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии b);

d. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT_1 ;

где время восстановления RT_1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В еще одном варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии от 1,5% до 4,5% масс./об. или от 2,5% до 4,2% масс./об. сахарозы или трегалозы или их смеси, и от или выше 50 мМ до 200 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного

распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

а. получения белкового состава, содержащего белок, от 1,5% до 4,5% масс./об. или от 2,5% до 4,2% масс./об сахарозы или трегалозы или их смеси и от или выше 50 мМ до 200 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей;

б. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии а);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии б);

д. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ. Данное изобретение также относится к способу снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, включающему сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии сахара, одной или более аминокислот и поверхностно-активного вещества.

Кроме того, данное изобретение относится к способу снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением, включающему стадии:

а. получения белкового состава, содержащего белок, сахар, одну или более аминокислоту и поверхностно-активное вещество;

б. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии а);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии б);

д. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислота присутствует в количестве от или выше 50 мМ до 200 мМ.

Поверхностно-активные вещества, доступные для применения в способах в соответствии с данным изобретением, включают, но не ограничены ими, неионные поверхностно-активные вещества, ионные поверхностно-активные вещества и цвиттерионные поверхностно-активные вещества. Типовые поверхностно-активные вещества для применения в соответствии с данным изобретением включают, но не

ограничены ими, сложные эфиры сорбита и жирных кислот (например, сорбитанмонокаприлат, сорбитанмонолаурат, сорбитанмонопальмитат), сорбитантриолеат, сложные эфиры глицерина и жирных кислот (например, глицеринмонокаприлат, глицеринмономирилат, глицеринмоностеарат), сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноинолеат), сложные эфиры жирных кислот полиглицерина (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноинолеат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, полиоксиэтиленсорбитанмоностеарат, полиоксиэтиленсорбитанмонопальмитат, полиоксиэтиленсорбитантриолеат, полиоксиэтиленсорбитантристеарат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирных кислот (например, полиоксиэтиленсорбиттетрастеарат, полиоксиэтиленсорбиттетраолеат), сложные эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирных кислот (например, полиоксиэтиленглицерилмоностеарат), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, полиэтиленгликольдистеарат), простые эфиры полиоксиэтиленалкила (например, полиоксиэтиленлауриловый эфир), полиоксиэтиленполиоксипропиленалкиловые эфиры (например, полиоксиэтиленполиоксипропиленгликоль, полиоксиэтиленполиоксипропиленпропиловый эфир, полиоксиэтиленполиоксипропиленцетиловый эфир), полиоксиэтиленалкилфениловые эфиры (например, полиоксиэтиленнонилфениловый эфир), полиоксиэтиленовые гидрогенизированные касторовые масла {например, полиоксиэтиленовое касторовое масло, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло}, производные пчелиного воска полиоксиэтилена (например, пчелиный воск полиоксиэтиленсорбитола), производные полиоксиэтиленланолина (например, полиоксиэтиленланолин) и амиды полиоксиэтиленжирных кислот (например, амид полиоксиэтиленстеариновой кислоты); C_{10} - C_{18} алкилсульфаты (например, цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат натрия), сульфат полиоксиэтилен C_{10} - C_{18} алкилового эфира с добавлением в среднем от 2 до 4 молей единиц этиленоксида (например, полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия) и соли сложного эфира C_1 - C_{18} алкилсульфосукцината (например, сложный эфир лаурилсульфосукцината натрия); и природные поверхностно-активные вещества, такие как лецитин, глицерофосфолипид, сфингофосфолипиды (например, сфингомиелин), и сложные эфиры сахарозы C_{12} - C_{18} жирных кислот. Предпочтительными поверхностно-активными веществами являются сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80, более предпочтительно, полисорбат 20 или полисорбат 80.

Поверхностно-активные вещества обычно присутствуют в количестве от 0,01% масс./об. до 1,0% масс./об., предпочтительно, от 0,02% масс./об. до 0,1% масс./об. или даже предпочтительно от 0,02% масс./об. до 0,05% масс./об. Предпочтительно, поверхностно-активным веществом является полисорбат 20 или полисорбат 80, и оно

присутствует в количестве от 0,02% масс./об. до 0,05% масс./об., например, 0,02, 0,03, 0,04 или 0,05% масс./об.

В одном варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии сахарозы или трегалозы или их смеси, одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей, и поверхностно-активного вещества, выбранного из полисорбата. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент и/или полисорбатом является полисорбат 20. Антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

a. получения белкового состава, содержащего белок, сахарозу или трегалозу или их смеси и одну или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей и полисорбатного поверхностно-активного вещества;

b. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии a);

c. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии b);

d. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT_1 ;

где время восстановления RT_1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислот присутствует в количестве от или выше 50 мМ до 200 мМ. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент и/или полисорбатным поверхностно-активным веществом является полисорбат 20. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии от 1% до 20% масс./об. сахарозы или трегалозы или их смеси, от 50 мМ до 250 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей, и от 0,01% масс./об. до 1,0% масс./об. полисорбата 20. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Антитело или его

фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

а. получения белкового состава, содержащего белок, от 1% до 20% сахарозы или трегалозы или их смеси и от или выше 50 мМ до 250 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей и от 0,01% масс./об. до 1,0% масс./об. полисорбата 20;

б. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии а);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии б);

д. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В еще одном варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии от 1,5% до 4,5% масс./об. или от 2,5% до 4,2% масс./об. сахарозы или трегалозы или их смеси, от или выше 50 мМ до 200 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент и от 0,02% масс./об. до 0,1% масс./об. полисорбата 20. Антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

В другом варианте, способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава в соответствии с данным изобретением включает стадии:

а. получения белкового состава, содержащего белок, от 1,5% до 4,5% масс./об. или от 2,5% до 4,2% масс./об. сахарозы или трегалозы или их смеси и от или выше 50 мМ до 200 мМ одной или более аминокислот, выбранных из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей и от 0,02% масс./об. до 0,1% масс./об. полисорбата 20;

б. сушки распылением белкового состава, полученного на стадии а);

с. выделения высушенного распылением белкового состава со стадии б);

д. восстановления, предпочтительно, водой, выделенного высушенного

распылением белкового состава в течение времени восстановления RT_1 ;

где время восстановления RT_1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахарозы или трегалозы или их смеси, и одной или более аминокислоты, выбранной из группы глицина, L-пролина, L-аланина, L-валина, L-серина, L-треонина, L-глутамина, L-аспарагина, L-глутамата, L-аспартата, L-гистидина, L-лизина, L-аргинина или их смесей. Предпочтительно, белком является антитело или его фрагмент. Указанное антитело или его фрагмент необязательно конъюгировано с полимером, таким как ПЭГ.

Белковый состав для сушки распылением имеет pH от 4,0 до 7,5, предпочтительно, от 4,0 до 6,0, более предпочтительно, от 5,0 до 6,0, например, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0. Для поддержания постоянного pH, белковый состав для сушки распылением содержит буферный агент. Существует множество буферных агентов, применяемых в области фармацевтики белковых составов, таких как, но не ограниченных ими, цитрат, фосфат, лактат, гистидин, глутамат, малеат, тартрат или сукцинат. Предпочтительные виды буфера обычно выбирают из тех, которые имеют pK_a , близкий к (± 1 pH единица) предпочтительному pH для оптимальной стабильности белка для поддержания высокой буферной емкости, и они связаны с максимальной продемонстрированной стабильностью, наблюдаемой для конкретного белка при помещении в ряд различных видов буферов. Приемлемые интервалы pH состава обычно выбирают из тех, которые связаны с максимальной продемонстрированной стабильностью, наблюдаемой для конкретного белка при помещении в ряд составов с разным pH. Буферирующим агентом также может быть аминокислота или смесь аминокислот, предпочтительно, в концентрации от 10 mM до 100 mM, от 10 mM до 80 mM, от 10 mM до 60 mM, от 15 mM до 60 mM, предпочтительно, от 10 mM до 50 mM, например, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 mM. В качестве не ограничивающего примера, буфером может быть гистидиновый буфер в концентрации от 10 mM до 100 mM.

Дополнительные эксципиенты могут применяться в способах и процессах в соответствии с данным изобретением. Эти эксципиенты включают, но не ограничены ими, агенты, улучшающие вязкость, объемобразующие агенты, солюбилизующие агенты, такие как моносахариды, например, фруктозу, мальтозу, галактозу, глюкозу, D-маннозу, сорбозу и подобные; полисахариды, например, раффинозу, мелезитозу, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и подобные; и многоатомные спирты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит) и подобные; полиэтиленгликоли (например, ПЭГ100, ПЭГ300, ПЭГ600, ПЭГ1500, ПЭГ2000, ПЭГ3000, ПЭГ3350, ПЭГ4000, ПЭГ6000, ПЭГ8000 или ПЭГ20000), поливинилпирролидон, триметиламин N-оксид, триметилглицин или их сочетания.

До введения композиции высушенного распылением белкового состава пациенту, ее необходимо восстановить растворителем. В соответствии с данным изобретением, предпочтительным растворителем является водный растворитель, более предпочтительно, водным растворителем является вода, даже более предпочтительно, является

стерилизованная вода.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что восстановление высушенного распылением белкового состава может быть проведено через несколько дней, недель или месяцев после того, как указанный высушенный распылением белковый состав в соответствии с данным изобретением выделен.

Объем растворителя, применяемый для восстановления, диктует концентрация белка, такого как антитело или его фрагмент, в полученном восстановленном высушенном распылением белковом составе. Восстановление меньшим объемом растворителя, чем объем до сушки распылением, дает состав, который более концентрирован, чем до сушки распылением, или наоборот.

Отношение восстановления (объем белкового состава до сушки распылением к растворителю, применяемому для восстановления высушенного распылением белкового состава) может варьироваться от 1:0,1 до 10:1. В предпочтительном варианте, отношение около 1:0,5 применяют так, чтобы полученная концентрация белка в восстановленном высушенном распылением белковом составе в два раза выше концентрации белкового состава до сушки распылением.

В данном изобретении также представлен высушенный распылением белковый состав, полученный способом в соответствии с данным изобретением. Предпочтительно, таким высушенным распылением белковым составом является состав антитела или состав фрагмента антитела.

Такой высушенный распылением белковый состав может храниться, до восстановления по требованию, в подходящем контейнере, таком как флакон, ампула, пробирка, бутылка или шприц (такой как заполненный шприц). Контейнер может быть частью составного комплекта, содержащего один или более контейнеров, содержащих высушенный распылением белковый состав, полученный способом в соответствии с данным изобретением, подходящие растворители для восстановления высушенного распылением белкового состава, устройства доставки, такие как шприц, заполненный шприц, шприц-ручка, безигольное устройство, имплантат или пластырь, или другие устройства для парентерального введения, и инструкции по применению.

Белковый состав или высушенный распылением белковый состав (альтернативно названный восстановленным белковым составом после восстановления), полученный способом в соответствии с данным изобретением, предназначен для применения в терапии или диагностике.

Восстановленные белковые составы, полученные способами в соответствии с данным изобретением, вводят в терапевтически эффективном количестве. Термин “терапевтически эффективное количество” в данном описании относится к количеству белка (т.е. антитела), необходимому для лечения, облегчения или предотвращения рассматриваемого заболевания, расстройства или состояния, или для оказания определяемого терапевтического, фармакологического или профилактического действия. Для любого антитела или его антиген-связывающего фрагмента, терапевтически

эффективное количество может быть определено изначально либо в анализах клеточной культуры, либо в животных моделях, обычно у грызунов, кроликов, собак, свиней или приматов. Животная модель также может применяться для определения подходящего интервала концентрации и способа введения. Такая информация затем может применяться для определения полезных доз и способов введения у человека.

Точное терапевтически эффективное количество для человека зависит от тяжести болезненного состояния, общего состояния здоровья, возраста, массы тела и пола субъекта, диеты, времени и частоты введения, сочетания лекарственных средств, реакций чувствительности и переносимости/ответа на терапию. Это количество может быть определено обычным экспериментированием, и находится в компетенции клинициста. Обычно, терапевтически эффективное количество антитела будет составлять от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг, например, от 0,1 мг/кг до 200 мг/кг или от 1 мг/кг до 100 мг/кг.

Подходящая доза будет варьироваться в зависимости от, например, конкретного применяемого антитела, лечимого субъекта, способа введения и природы и тяжести лечимого состояния. В конкретном варианте восстановленный высушенный распылением белковый состав, полученный способами в соответствии с данным изобретением, вводят подкожным путем или внутримышечной инъекцией.

Далее изобретение будет описано с помощью примеров со ссылками на варианты, показанные на прилагаемых чертежах.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Гуманизированное IgG моноклональное антитело (mAb1), имеющее изоэлектрическую точку (pI) около 6,1, получают в водном растворе в концентрации 160 мл/мл в 30 мМ гистидина, 200 мМ сорбита, pH 5,6. Все эксципиенты получают от Sigma-Aldrich (Steinheim™, Germany).

Amicon Ultra-15 30K (Millipore™) центрифужные фильтры для объемов вплоть до 15 мл применяют для проведения буферного обмена. Проводят четыре цикла разведения 2-3 раза, включая периодическое центрифугирование в течение 2 недель при 20°C (относительное центробежное ускорение=4000·г). Исходные растворы готовят в 15 мМ гистидиновом буфере при pH 5,6. Все составы содержат 2,5% сахарозы (эквивалент 73 мМ сахарозы). Концентрации аминокислот, применяемых в этом исследовании, показаны в таблице 1.

Таблица 1

Аминокислота (в дополнение к буферу и 2,5% сахарозе)	мМ
глицин	100
L-серин	100
L-цистеин	100
L-изолейцин	75

L-глутамин	100
L-аланин	100
L-аргинин HCl	75
L-пролин	100
L-лейцин	75
L-фенилаланин	75
L-лизин HCl	100
L-триптофан	25

После буферного обмена составы разводят соответствующими исходными растворами до концентрации mAb1 50 мл/мл до сушки распылением.

Сушку распылением проводят на Büchi Mini Spray dryer B-290, где выходящий воздух пропускают через осушитель (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). Температуру на входе устанавливают 120°C, и температура на выходе составляет 55-60°C. Аспиратор устанавливают на 100%, что соответствует скорости потока воздуха 35 м³/ч. Уставки скорости для потока жидкого сырья составляют 3 мл/мин, согласно 10% скорости накачки, и 600 л/ч для распыляющего потока N₂. Составы (9-15 мл) распыляют с помощью двухлоточной форсунки (внутренний диаметр жидкостного отверстия 0,7 мм). После сушки распыления порошки собирают через центрифугу в стеклянный контейнер, переносят в пластиковый флакон и хранят в холодильнике при 2-8°C. Для каждого состава четыре флакона заполняют высушенным распылением порошком, содержащим приблизительно 100 мг mAb1. Три флакона применяют для оценки времени восстановления.

Высушенные распылением составы восстанавливают с 0,9 мл MilliQ-воды до концентрации приблизительно 100 мл/мл. Время полного растворения порошка визуально наблюдают и записывают. Три образца восстанавливают для исследования изменений во времени восстановления для данного состава. При восстановлении концентрацию mAb1 определяют неразбавленной УФ абсорбцией при 280 нм с SoloVPE (CE Technologies), соединенным с УФ-видимым спектрофотометром Cary50Bio (Varian), с коэффициентом ослабления $\epsilon=1,33 \text{ мл.мг}^{-1}.\text{см}^{-1}$.

Высушенные распылением составы восстанавливают трижды, среднее значение и стандартное отклонение рассчитывают для разных высушенных распылением mAb1 составов. Все составы показывают более быстрое время восстановления по сравнению с 2,5% сахарозой, за исключением составов с лейцином и фенилаланином (Фигура 1). Состав, содержащий лейцин, имел очень сильную мутность и присутствие высоких количества агрегатов (данные не показаны), что влияет на время восстановления. Наоборот, состав, содержащий фенилаланин, был прозрачный и показан незначительное образование (суб)видимых частиц (данные не показаны), но все равно показал более высокое, чем только сахароза, время восстановления. Эти эксперименты показали, что сочетание сахара, такого как сахароза, в сочетании с аминокислотой, такой как глицин,

серин, цистеин, изолейцин, глутамин, аланин, аргинин, пролин, лизин и триптофан, снижает время восстановления высушенного распылением состава антитела по сравнению с только сахарозой.

Пример 2

Анализируют действие поверхностно-активного вещества на снижение времени восстановления. Диафильтрацию тангенциального потока используют для обмена буфера для хранения mAb1 на водный исходный раствор (pH 5,0), содержащий либо сахар (0,1 М) и лактат (0,05 М), либо L-аргинин HCl (0,24 М), трегалозу (0,1 М) и L-гистидин (0,05 М). после стадии диафильтрации растворы далее концентрируют и фильтруют (полиэфирсульфон, 0,22 мкм, Merck Millipore, Bedford Massachusetts, U.S.). Концентрацию составов mAb1 измеряют с помощью УФ абсорбции при 280 нм при коэффициенте ослабления $1,33 \text{ (мл/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$, и доводят до 100 мл/мл. Растворы сырья во время скрининга состава готовят добавлением фильтрованных (0,22 мкм) растворов оставшихся эксципиентов. В растворы, применяемые во время процесса скрининга технологических параметров СР (таблица 2), добавляют точно измеренное количество полисорбата 20 и разводят ультрачистой водой (тип 1 ($\rho \geq 18,2 \text{ М}\Omega\text{см}$ при 25°C) и фильтруют (0,22 мкм)) до их конечных концентраций. Исходный раствор гидроксида натрия, моногидрат моногидрохлорида L-гистидина и полисорбат 20 получают от Merck (Darmstadt, Germany). Моногидрохлорид L-аргинина, моногидрохлорид L-лизина и дигидрат D(+)-трегалозы получают от Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, U.S.). D(+)-Сахарозу покупают у Applichem (Darmstadt, Germany). L-гистидин покупают у Merck и Sigma-Aldrich для составления и технологического скрининга параметров высушенных распылением (СР) составов, соответственно. Исходные растворы молочной кислоты и хлористоводородной кислоты получают от Fisher scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.).

Сырьевые растворы для экспериментов скрининга составов сушат распылением при концентрации mAb1 50 мл/мл и общим объемом сырья 15 мл, с применением Büchi B-290 Mini Spray Dryer, оборудованного 0,7 мМ двухлоточной форсункой, высокоэффективной центрифугой, небольшим сосудом для сбора и осушителем B-296 Dehumidifier (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland). Настройки основаны на внутренней процедуре и остаются постоянными для всех экспериментов по скринингу составов. Температуру входящего воздуха устанавливают 120°C (температуру на выходе отслеживают и варьируют $55\text{--}60^\circ\text{C}$), скорость потока воздуха на входе составляет 580 л/мин, скорость потока N_2 форсунки составляет 10 л/мин, и скорость раствора сырья устанавливают 3 мл/мин.

Порошок из сосуда для сбора (коллектора) затем объединяют с порошком, восстановленным из центрифуги, и распределяют в 2 мл трубчатые стеклянные инъекционные флаконы I типа (Schott AG, Mainz, Germany), закрывают FluroTec

резиновыми инъекционными пробками (West pharmaceutical services, West Whiteland Township, Pennsylvania, U.S.) и алюминиевыми обкатками (Adelphi healthcare packaging, West Sussex, U.K.). Наконец, образцы хранят либо при 5°C, либо при 40°C в течение 4 недель, затем хранят при 5°C до восстановления.

Таблица 2

	Соли аминокислот	мМ	Сахар (50 мМ; ≈1,7%)	Поверхностно- активное вещество (2 мМ)
1	Нет соли аминокислоты	0	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
2	HisHCl	120 мМ	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
3	ArgHCl	120 мМ	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
4	LysHCl	120 мМ	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
5	HisHCl & ArgHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
6	HisHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
7	ArgHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
8	HisHCl & ArgHCl & LysHCl	40 мМ каждый	Сахароза	Нет поверхностно-активного вещества
9	Нет соли аминокислоты	0	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
10	HisHCl	120 мМ	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
11	ArgHCl	120 мМ	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
12	LysHCl	120 мМ	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
13	HisHCl & ArgHCl	60 мМ каждый	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
14	HisHCl & LysHCl	60 мМ	Трегалоза	Нет поверхностно-

		каждый		активного вещества
15	ArgHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
16	HisHCl & ArgHCl & LysHCl	40 мМ каждый	Трегалоза	Нет поверхностно-активного вещества
17	Нет соли аминокислоты	0	Сахароза	Полисорбат 20
18	HisHCl	120 мМ	Сахароза	Полисорбат 20
19	ArgHCl	120 мМ	Сахароза	Полисорбат 20
20	LysHCl	120 мМ	Сахароза	Полисорбат 20
21	HisHCl & ArgHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Полисорбат 20
22	HisHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Полисорбат 20
23	ArgHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Сахароза	Полисорбат 20
24	HisHCl & ArgHCl & LysHCl	40 мМ каждый	Сахароза	Полисорбат 20
25	Нет соли аминокислоты	0	Трегалоза	Полисорбат 20
26	HisHCl	120 мМ	Трегалоза	Полисорбат 20
27	ArgHCl	120 мМ	Трегалоза	Полисорбат 20
28	LysHCl	120 мМ	Трегалоза	Полисорбат 20
29	HisHCl & ArgHCl	60 мМ каждый	Трегалоза	Полисорбат 20
30	HisHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Трегалоза	Полисорбат 20
31	ArgHCl & LysHCl	60 мМ каждый	Трегалоза	Полисорбат 20
32	HisHCl & ArgHCl & LysHCl	40 мМ каждый	Трегалоза	Полисорбат 20

Данные, полученные для разных уровней факторов дизайна скрининга состава, используют для подбора регрессионных моделей, содержащих номинальные факторы, для каждой из реакций. Поскольку программное обеспечение JMP представляет номинальные переменные с помощью терминов, оценки параметров которых в среднем равны нулю по всем уровням, номинальные факторы n-уровня будут представлены n-1 индикаторными переменными для обработки. Поэтому только n-1 оценки параметров могут быть

получены непосредственно для скрининга состава, поскольку оценки параметров были рассчитаны путем взятия разности между средней реакцией, соответствующей определенному уровню, и средней реакцией по всем уровням. Оценки параметров для конечного уровня фактора затем рассчитывают отдельно на основе знания того, что оценки параметров по всем уровням номинальной переменной ограничены суммой до нуля, т. е. окончательная величина была рассчитана как отрицательный результат суммы оценок по другим $n-1$ уровням. Это подразумевает зависимость между расширенными оценками параметров (инструкция JMP Genomics 8).

Высушенные распылением составы восстанавливают трижды в количестве 100 мл/мл, дважды от mAb1 концентрации до сушки распылением в растворах сырья, и расширенные оценки значения параметров для полученной модели показаны на фигуре 2. Оценки значения параметров были значительны на 0,05 уровне для фактора поверхностно-активного вещества и уровней соли отдельной аминокислоты L-аргинин HCl и L-гистидин HCl.

Добавление полисорбата 20 вместо сахара не вызывает снижение времени восстановления. На фигуре 3 показано сравнение времени восстановления, полученного для высушенных распылением составов mAb1, содержащих сахарозу и глицин, сахарозу и аланин, сахарозу и аргинин и сахарозу и пролин из примера 1, против высушенных распылением составов, содержащих полисорбат 20 вместо сахарозы. Как показано на фигуре 3, время восстановления в каждом случае было хуже для аминокислот в сочетании с поверхностно-активным веществом при отсутствии сахарозы.

Также, как показано на фигурах 4, 5, 6 и 7, время восстановления не снижается для состава, высушенного распылением в присутствии поверхностно-активного вещества (полисорбат 20) и сахара (сахарозы, как показано на фигурах 4 и 5, или трегалозы, как показано на фигурах 6 и 7) в отсутствие одной или более аминокислот, таких как L-аргинин HCl, L-лизин HCl, L-гистидин HCl или их сочетания.

Пример 3

Состав, содержащий 200 мл/мл Fab'-ПЭГ антитела, имеющий pI около 7,0, подвергают замене буфера с применением центрифужного фильтра Amicon Ultra-15-30K (Millipore), с различными составами аминокислот (глицина, аланина, пролина, лизина, серина, глутамина и аргинина) и сахарозы в 10 mM гистидиновом буфере pH 5,5.

Состав готовят как показано в таблице 3.

Таблица 3

Аминокислота (в дополнение к 2,5% сахарозе=73 mM)	(%)	mM
Глицин	0,25-2,5	34-333
Лизин	1	68
Пролин	1	87
Аланин	1	112

Серин	1	95
Глутамин	1	68
Аргинин	1	57

Сушку распылением составов проводят с применением распылительной минисушки Büchi B290, соединенной с осушителем В-296, применяемым для осушения сушащего воздуха до сушки распылением (уставки не требуются). Состав, содержащий 50 мл/мл Fab'-ПЭГ антитела, сушат распылением с применением параметров процесса, показанных в таблице 4.

Таблица 4

Параметр	Значение
Скорость отсасывания (входящий поток воздуха)	35 м³/ч (уставка: 100%)
Т воздуха на входе	120°C
Поток воздуха в форсунке	600 л/ч N ₂ (уставка: максимум)
Форсунка	0,7 мМ
Скорость накачки	~145 мл/ч (уставка: 10%)
Измеренная Т воздуха на выходе	53-72°C

Высушенные распылением продукты восстанавливают с 900 мкл воды MilliQ с получением концентрации 100 мл/мл. Измеряют время, требуемое порошку для полного растворения до прозрачного раствора. В t₀ три образца восстанавливают для оценки изменения времени восстановления для данного состава. Концентрацию Fab'-ПЭГ определяют УФ абсорбцией при 280 нм неразведенного раствора с применением SoloVPE (CE Technologies), соединенного с Cary50Bio УФ-фидимым спектрофотометром (Varian) или после разведения до приблизительно 1 мл/мл с применением планшетного ридера Spectramax M5 (Molecular Devices), с $\epsilon=0,86 \text{ мл.мг}^{-1}.\text{см}^{-1}$.

Как показано на фигуре 8, время восстановления высушенного распылением состава Fab'-ПЭГ антитела при 100 мл/мл в присутствии 2,5% сахарозы и повышающейся концентрации глицина снижается по сравнению с тем же составом без глицина (около 25 минут).

Другие тестированные аминокислоты также показали превосходный эффект в отношении времени восстановления состава, содержащего Fab'-ПЭГ антитело только в 2,5% сахарозе. Как показано на фигуре 9, включение выбранных аминокислот приводит к снижению времени восстановления по сравнению с только сахарозой (Gln > Ala > Ser > Gly > Lys > Arg > Pro).

Пример 4

Действие добавления аминокислот и/или сахара на время восстановления дополнительно анализируют. mAb1 предоставляют в водном растворе в концентрации 50 мл/мл в 15 мМ гистидина, pH5,6. Каждую из разных аминокислот (Arg-HCl; Gly-HCl, Lys-

HCl и Pro-HCl) и один сахар (трегалозу) тестируют при разной молярности (0, 50, 100 и 150 мМ для аминокислот и 30, 75, 120 мМ для сахара).

Полученные составы были такие, как показаны в таблице 5.

Таблица 5

Аминокислота (Arg; Gly, Lys или Pro; в мМ)	Сахар (трегалоза; мМ)
0	30
0	75
0	120
50	30
50	75
50	120
100	30
100	75
100	120
150	30
150	75
150	120

Сушку распылением составов, восстановление и оценку времени восстановления проводят как в примере 3.

Как показано на фигуре 10В, время восстановления высушенного распылением состава mAb1 в дозе 50 мл/мл (100 мл/мл при восстановлении) в присутствии сахара (здесь дисахарида трегалозы независимо от его молярности) и повышении концентрации Аргинина снижается по сравнению с тем же составом без аргинина (около 22 минут). На фигуре 10С подчеркнуто, что это действие дополнительно усиливается при объединении молярности сахара и аминокислота (суммарная молярность) до достижения плато (здесь около 200 мМ суммарной молярности).

Для сравнения, присутствие глицина не улучшает время восстановления для mAb1 независимо от его молярности или одного из сахаров.

Другие тестируемые аминокислоты (пролин и лизин) также показали тенденцию к снижению времени восстановления при учете суммарной молярности (см. фигуры 12С и 13С), хотя менее выраженную, чем Аргинин.

Пример 5

Действие добавления аминокислот и сахара на время восстановления дополнительно анализируют с mAb2 (гуманизированным IgG моноклональным антителом, имеющим pI около 7,6), при 50 мл/мл (100 мл/мл при восстановлении). Различные аминокислоты (Arg-HCl; Gly-HCl, Lys-HCl и Pro-HCl) и один сахар (трегалозу)

тестируют только при одной молярности (100 мМ для аминокислот и 75 мМ для сахара) в 15 мМ Гистидиновом буфере, рН 5,6, в присутствии 0,01% масс./об. PS20 (0,02% масс./об. при восстановлении). Контрольный состав не содержит аминокислоту.

Сушку распылением составов, восстановление и оценку времени восстановления проводят как в примере 3.

На фигуре 14 подчеркнуто, что хоть все тестируемые аминокислоты были способны снижать время восстановления по сравнению с составом, содержащим только 75 мМ сахара, наилучшие результаты получают с Аргинином, затем Пролином и Лизином.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, где способ включает сушку распылением белкового состава, содержащего белок в присутствии сахара и одну или более аминокислот, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислот присутствуют в количестве от или выше 50 мМ до 200мМ.

2. Способ по пункту 1, где белком является антитело или его фрагмент.

3. Способ по пунктам 1 или 2, где сахаром является сахароза, трегалоза или их смесь.

4. Способ по любому из представленных выше пунктов, где аминокислотами являются глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-серин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин или их смеси.

5. Способ по любому из представленных выше пунктов, где сахаром является сахароза или трегалоза, аминокислотой является гидрохлорид L-аргинина, гидрохлорид L-гистидина, гидрохлорид L-лизина или их смесь.

6. Способ по любому из представленных выше пунктов, где способ включает сушку распылением белкового состава, дополнительно содержащего поверхностно-активное вещество.

7. Способ по пункту 6, где поверхностно-активным веществом является полисорбат, предпочтительно, полисорбат 20.

8. Способ снижения времени восстановления высушенного распылением белкового состава, включающий стадии:

a. получения белкового состава, содержащего белок, сахар и одну или более аминокислот;

b. сушку распылением белкового состава, полученного на стадии a);

c. выделение высушенного распылением белкового состава со стадии b);

d. восстановление, предпочтительно водой, выделенного высушенного распылением белкового состава в течение времени восстановления RT1;

где время восстановления RT1 меньше, чем время восстановления того же белкового состава, полученного в отсутствие сахара и одной или более аминокислот, где сахаром является дисахарид, и он присутствует в количестве от 1,0 до 20% масс./об., и где одна или более аминокислота присутствует в количестве от около 50 мМ до 200 мМ.

9. Способ по пункту 8, где белком является антитело или его фрагмент.

10. Способ по пунктам 8 или 9, где сахаром является сахароза, трегалоза или их смесь.

11. Способ по любому из пунктов 8-10, где аминокислотой является глицин, L-пролин, L-аланин, L-валин, L-серин, L-треонин, L-глутамин, L-аспарагин, L-глутамат, L-аспартат, L-гистидин, L-лизин, L-аргинин или их смеси.

12. Способ по любому из пунктов 8-11, где сахаром является сахароза или трегалоза, и аминокислотой является гидрохлорид L-аргинина, гидрохлорид L-гистидина,

гидрохлорид L-лизина или их смесь.

13. Способ по любому из пунктов 8-12, где способ включает сушку распылением белкового состава, дополнительно содержащего поверхностно-активное вещество.

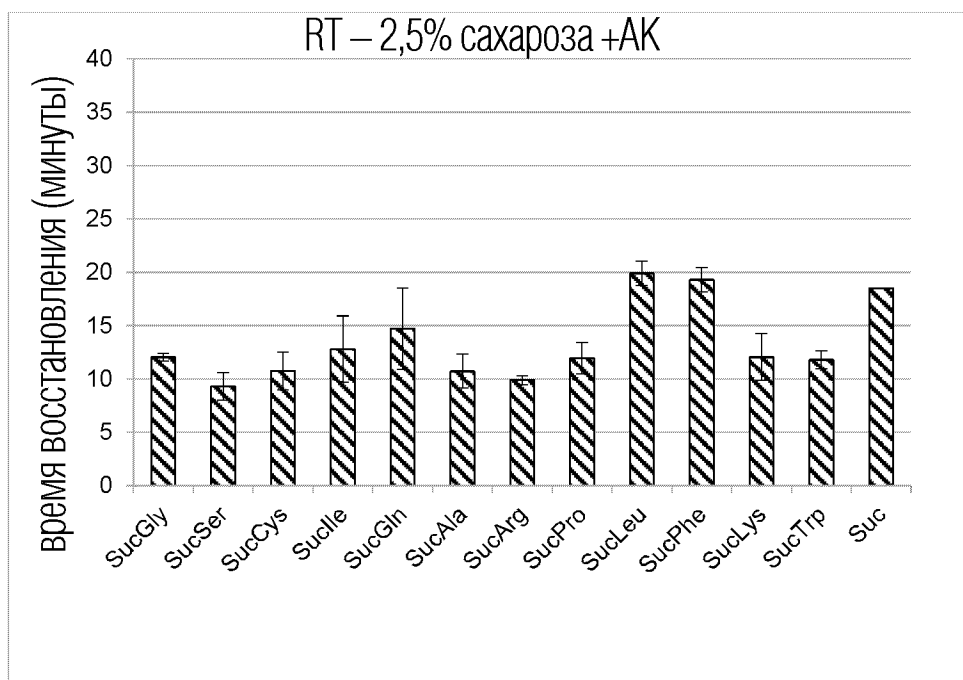
14. Способ по пункту 13, где поверхностно-активным веществом является полисорбат, предпочтительно, полисорбат 20.

15. Белковый состав, полученный способом по любому из пунктов 8-14.

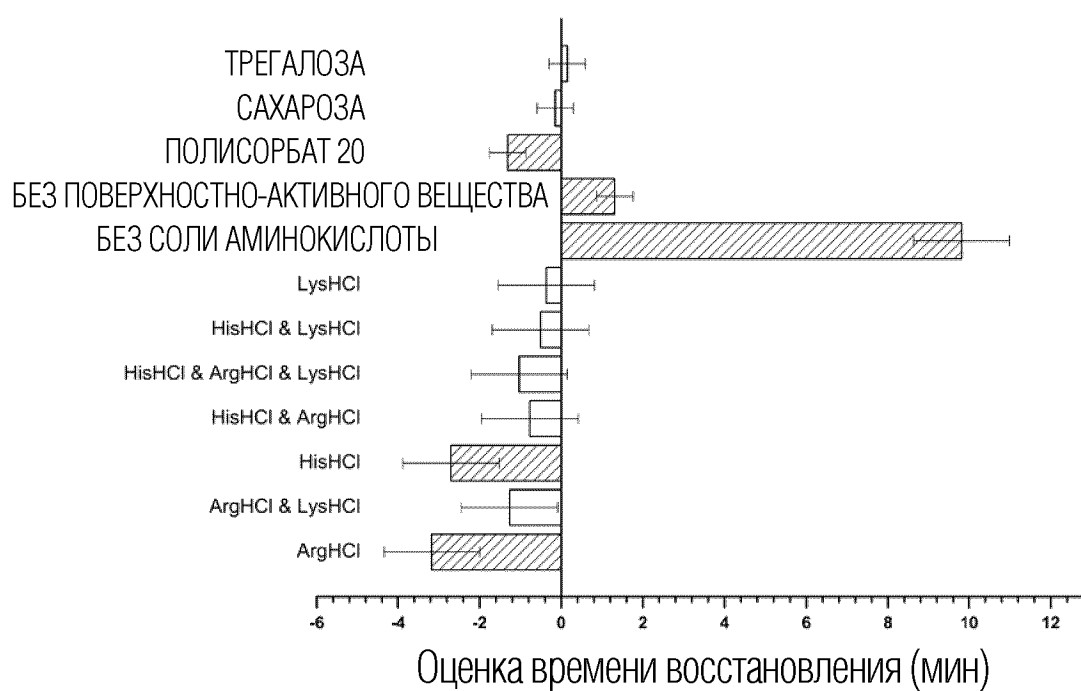
16. Белковый состав по пункту 15 для применения в терапии или диагностике.

1/10

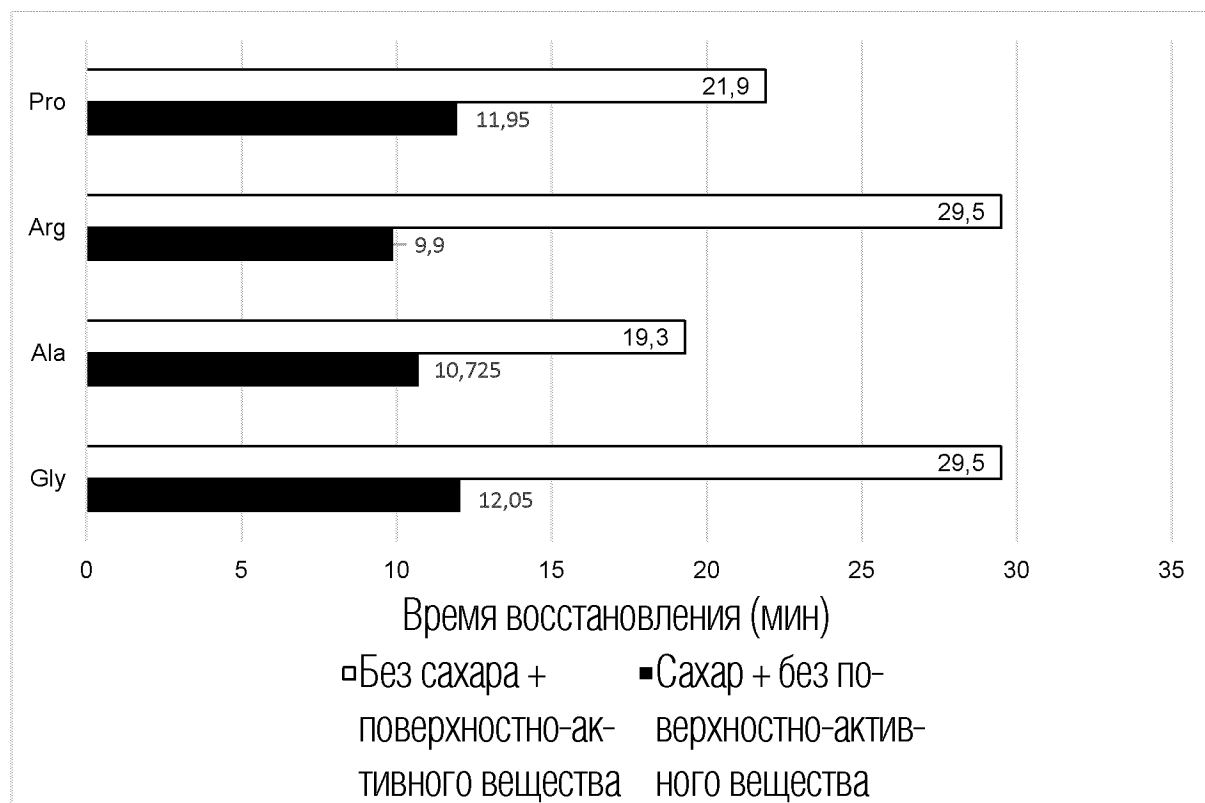
ФИГ. 1



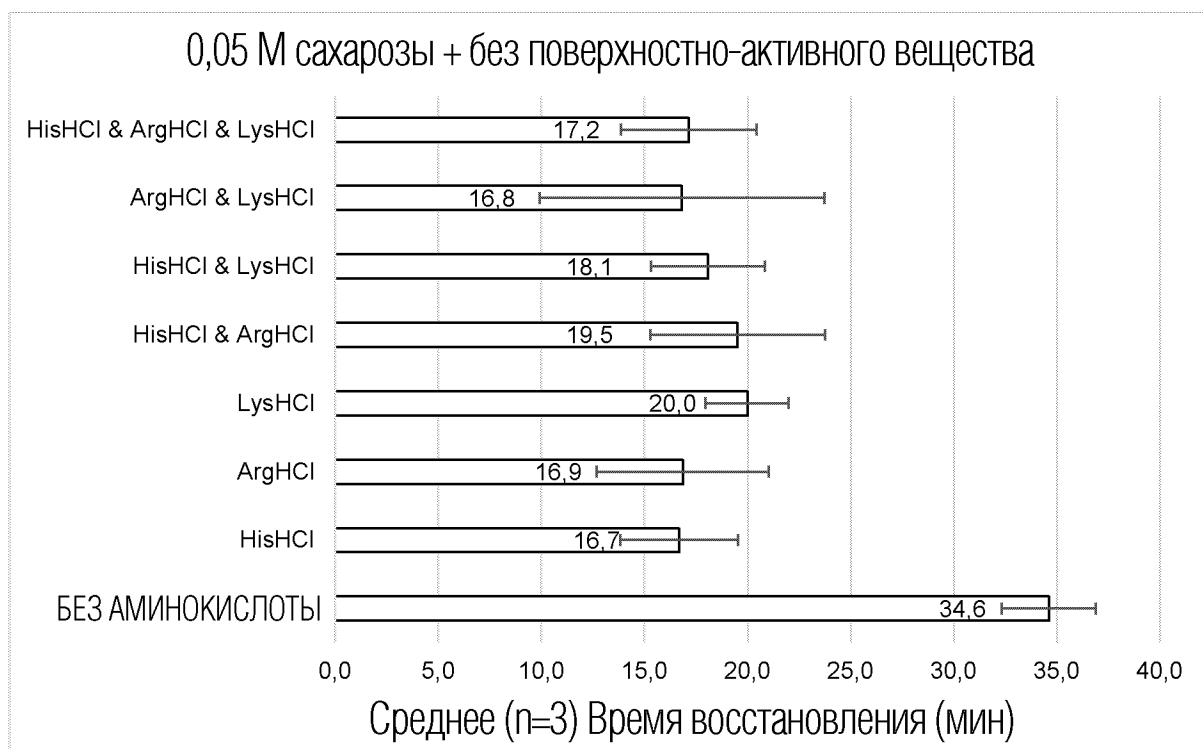
ФИГ. 2



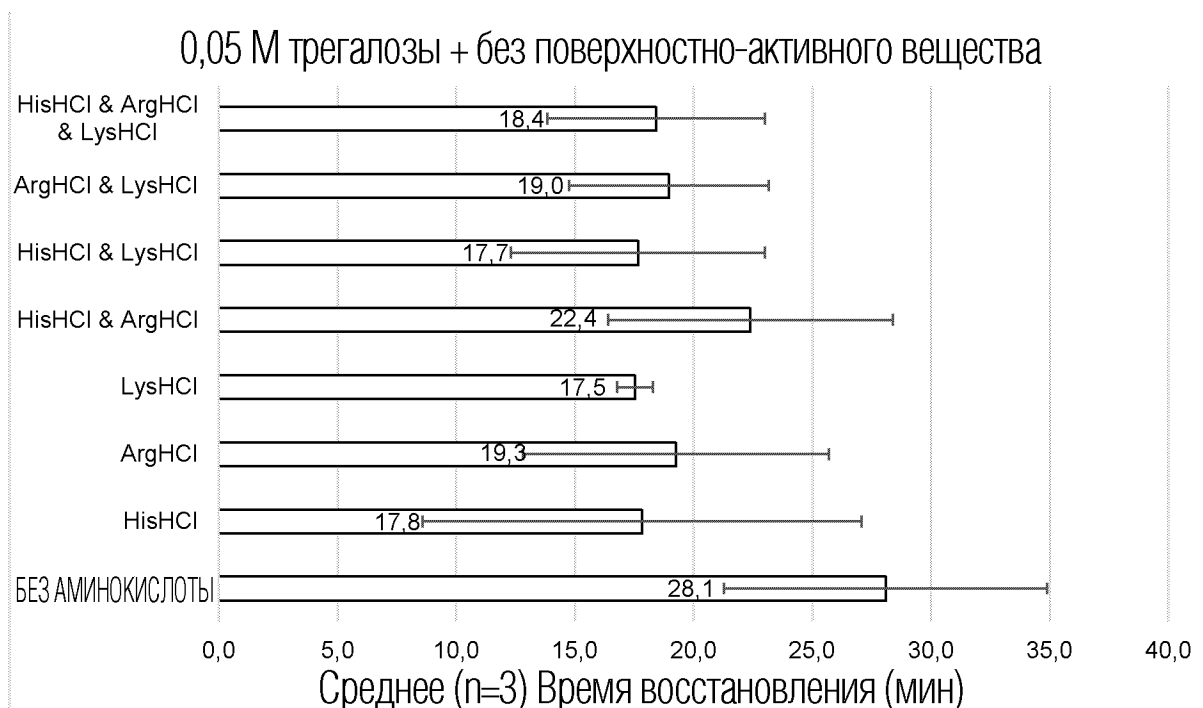
ФИГ. 3



ФИГ. 4

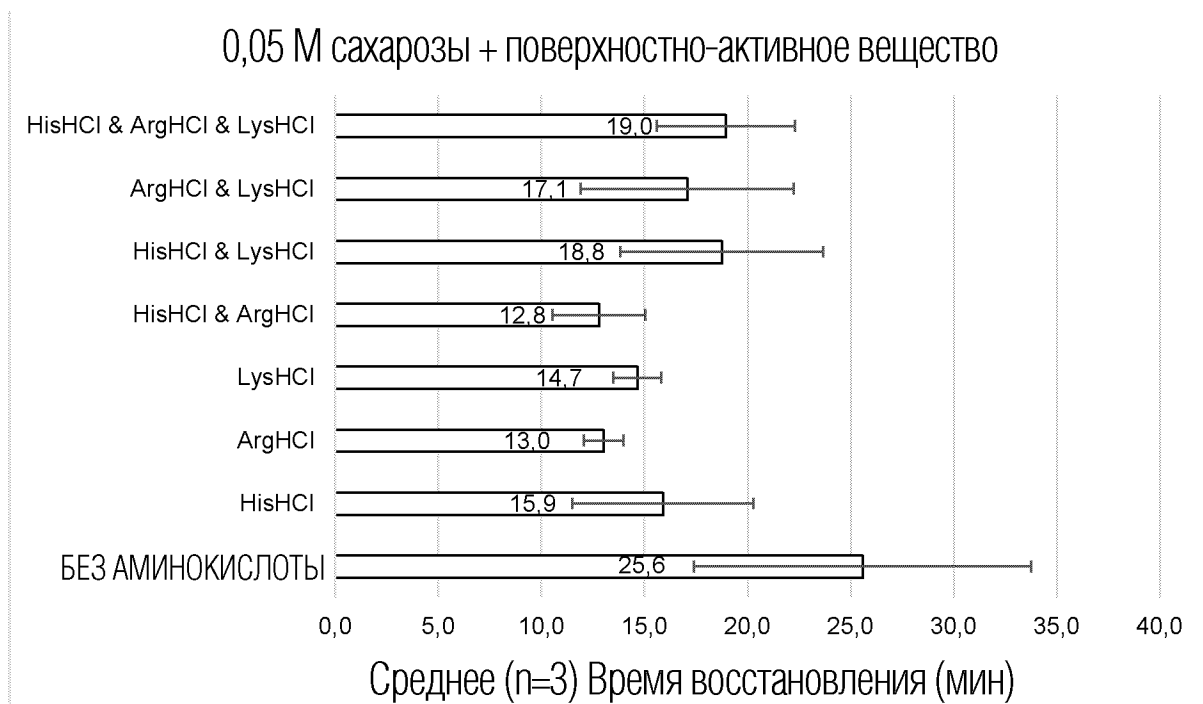


ФИГ. 5

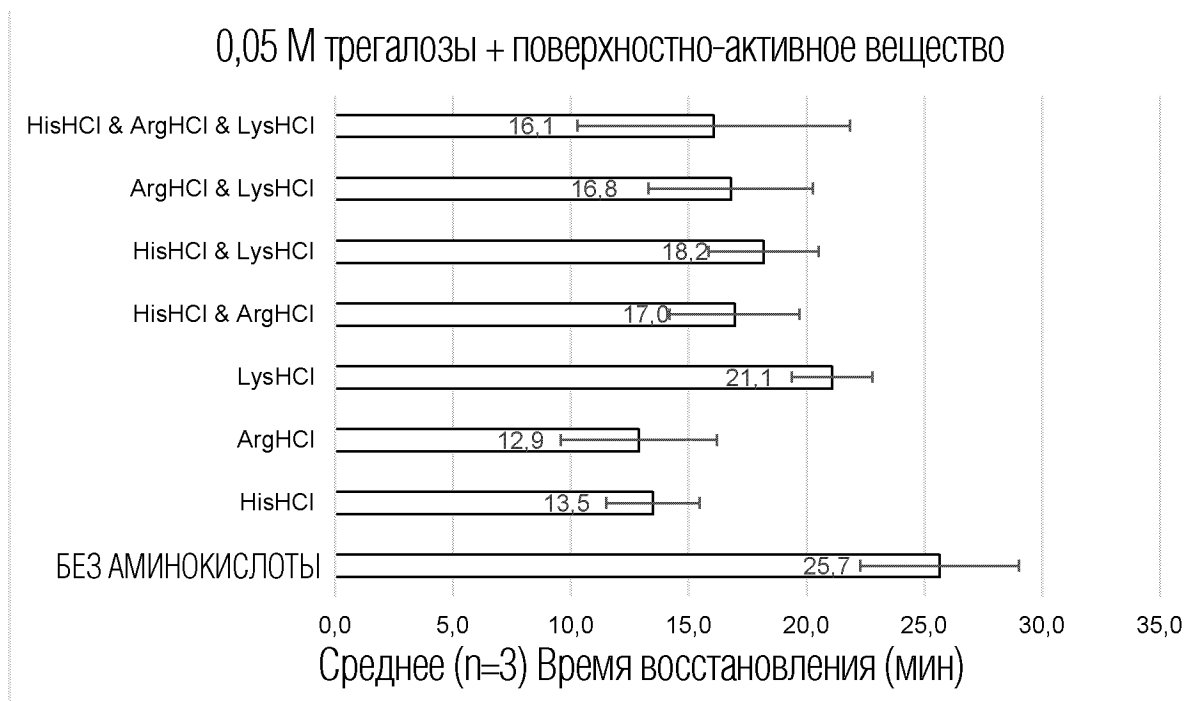


4/10

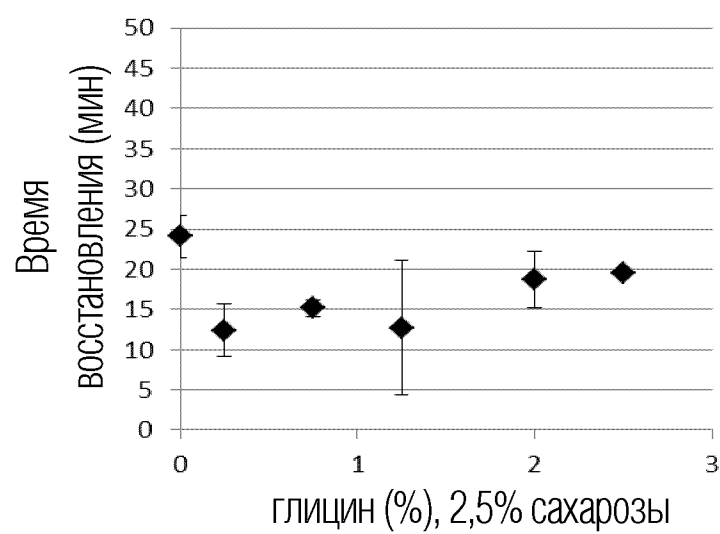
ФИГ. 6



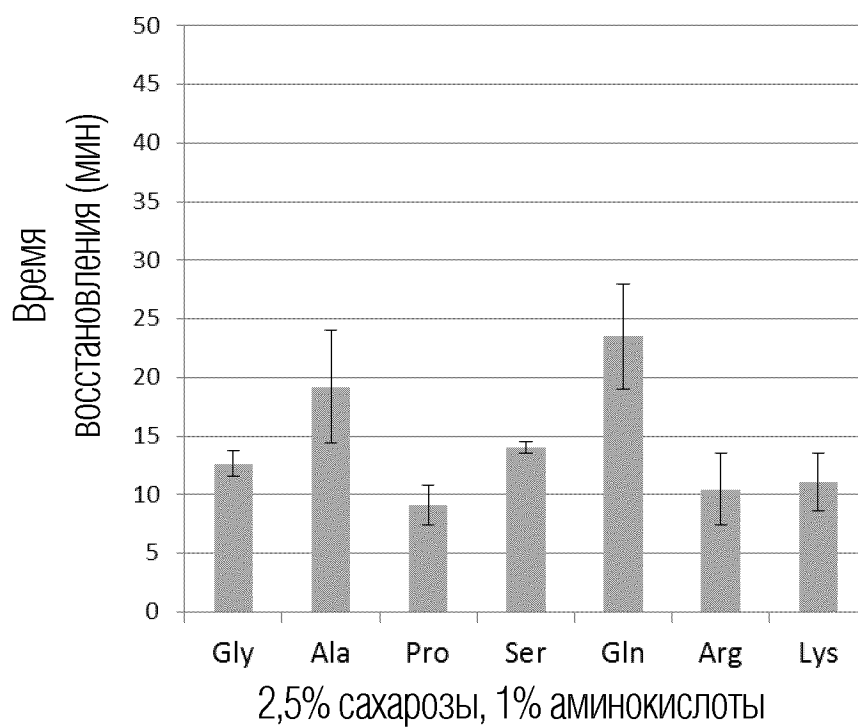
ФИГ. 7



ФИГ. 8

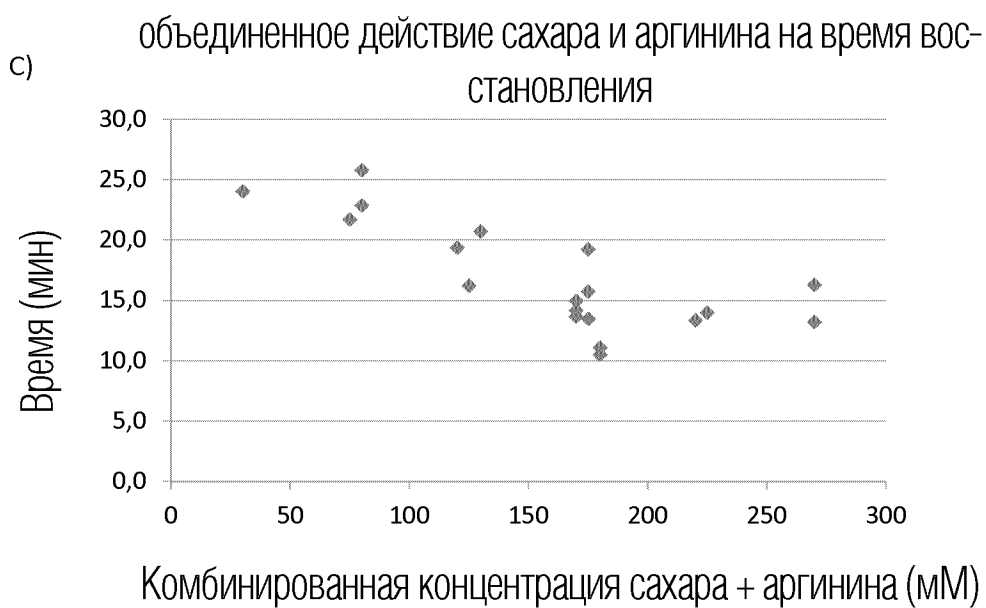
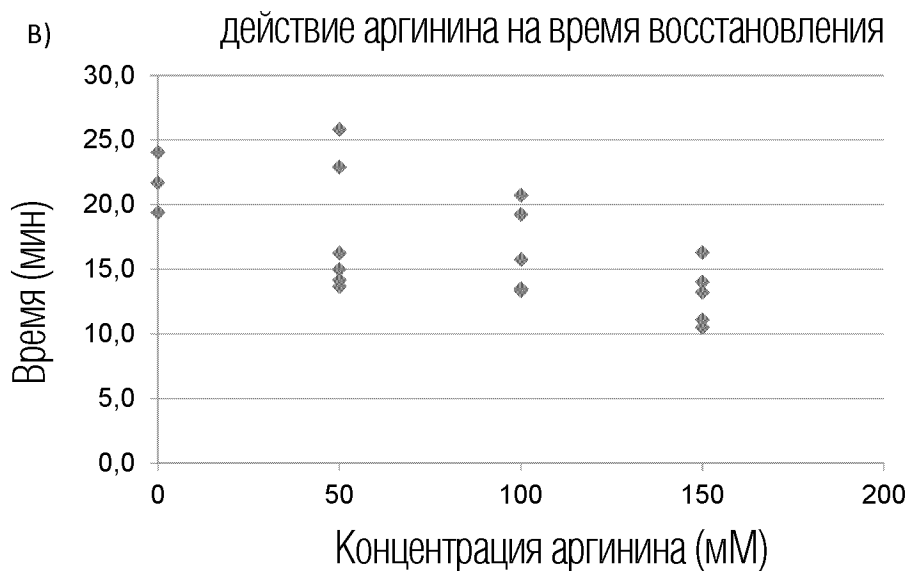
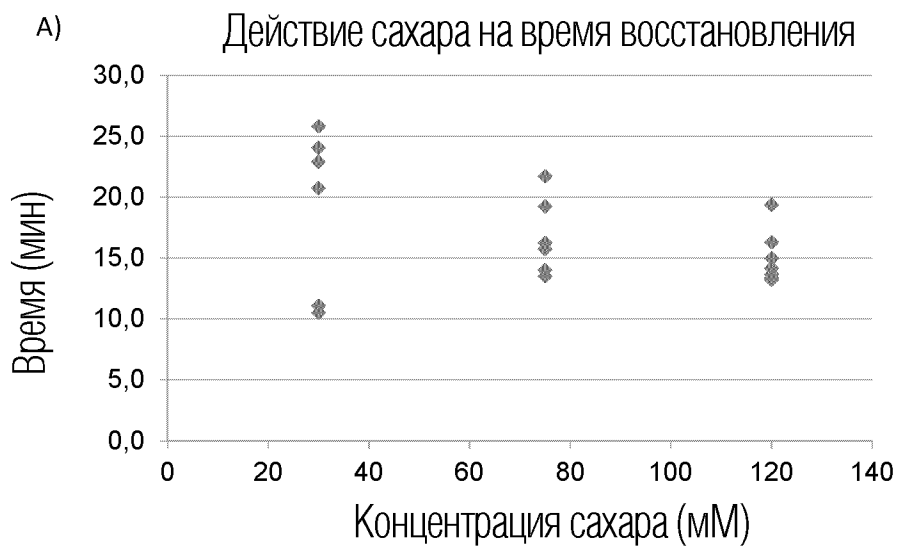


ФИГ. 9

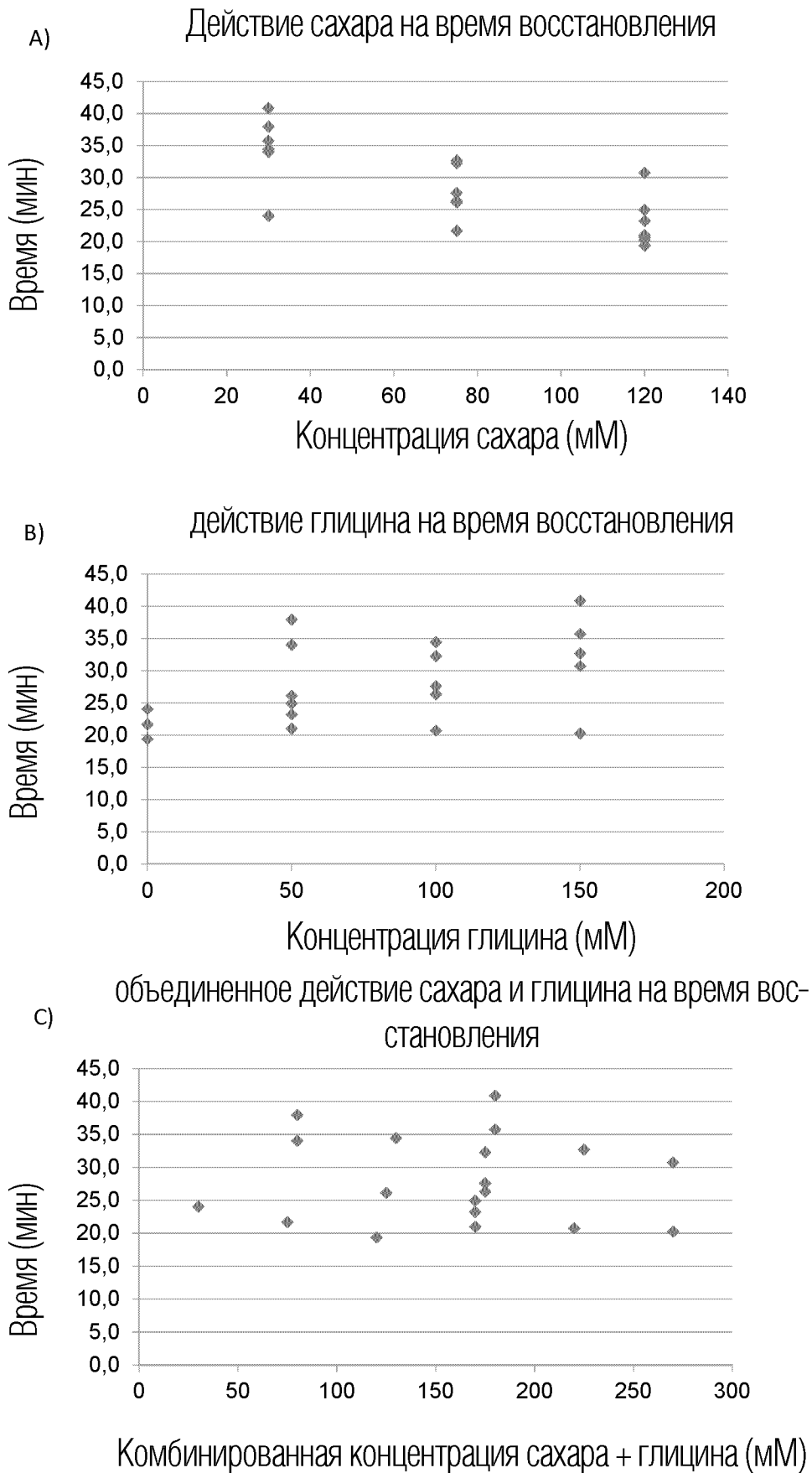


6/10

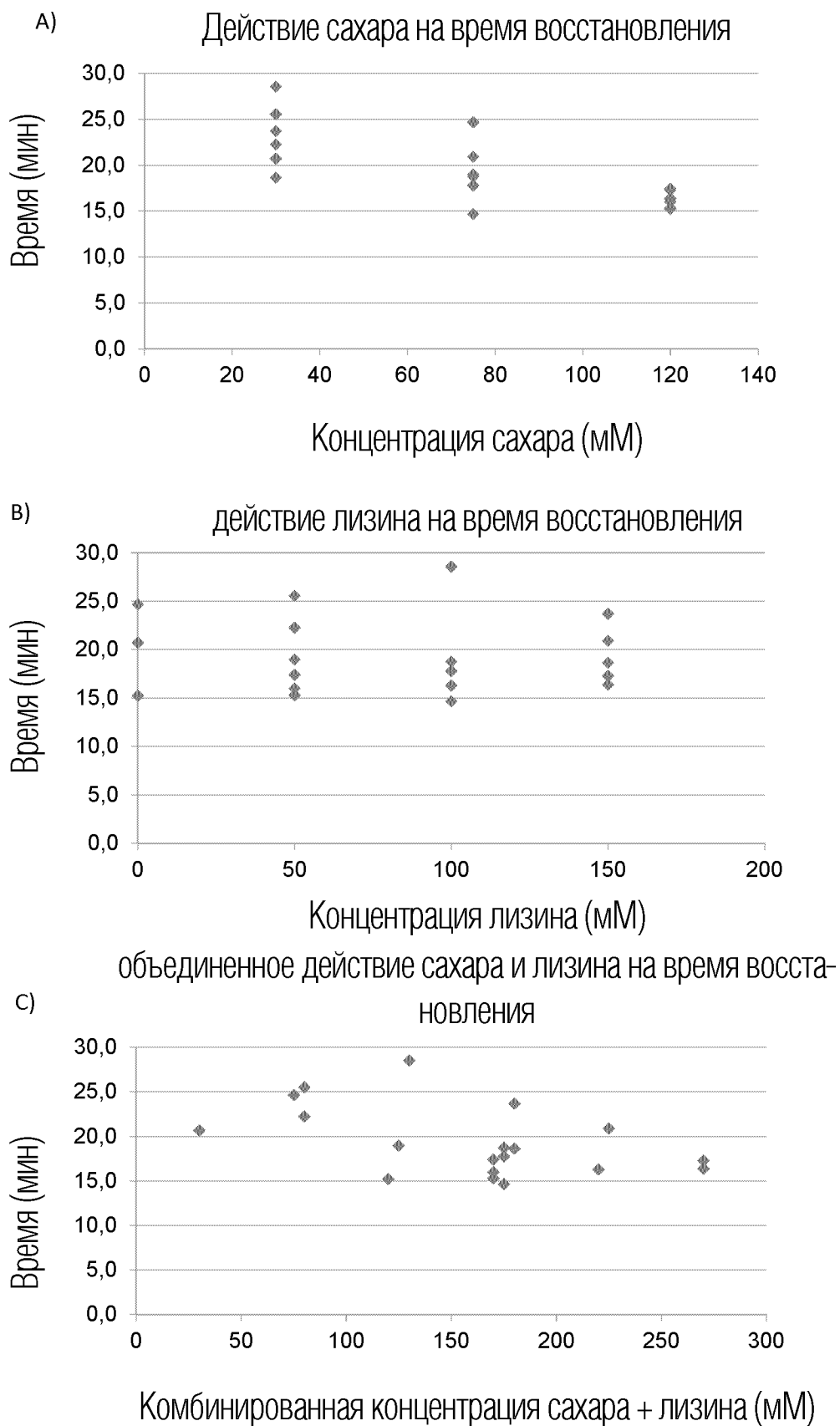
ФИГ. 10



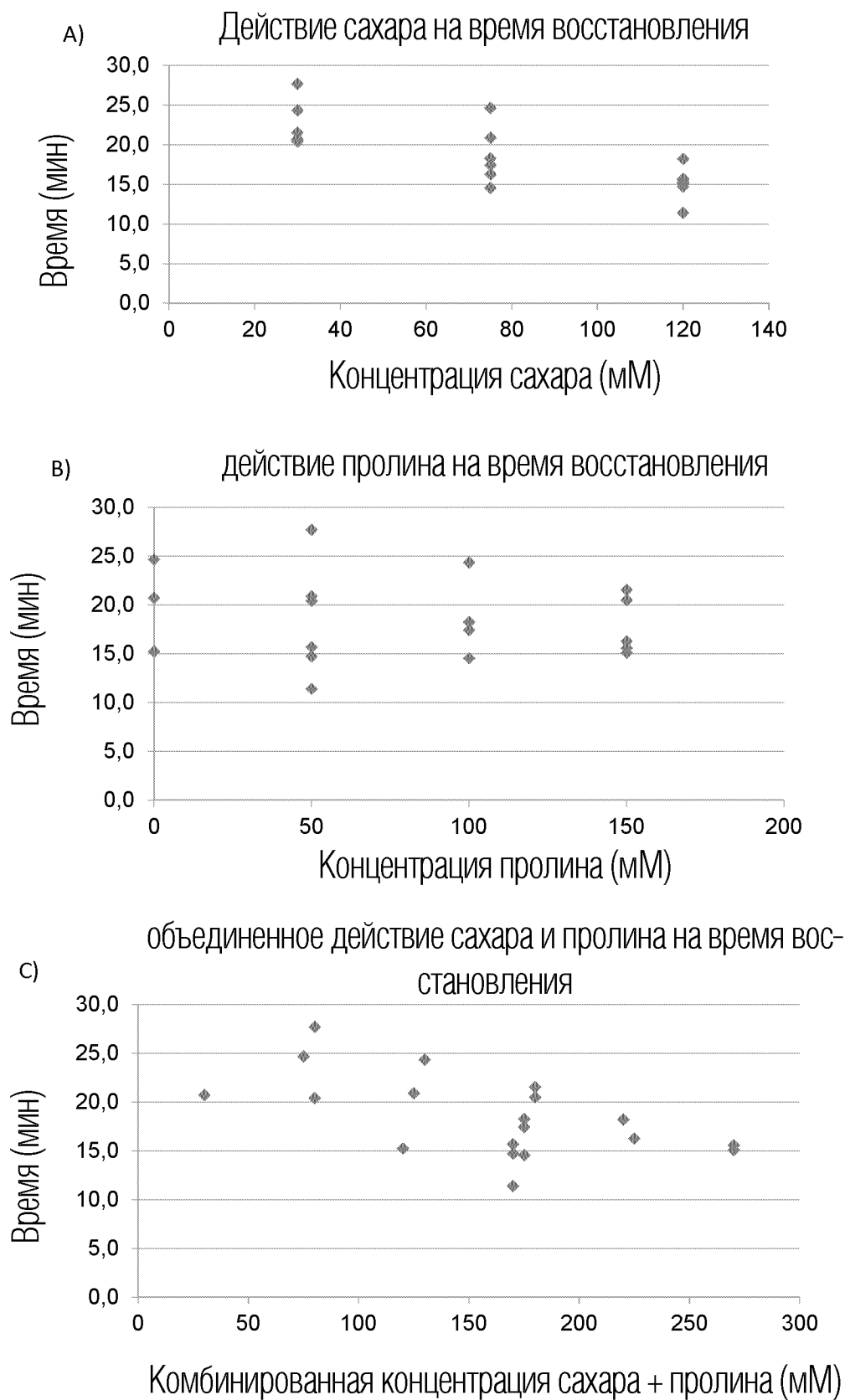
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14

Действие добавления аминокислоты на время восстановления

