(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190482 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.25

(22) Дата подачи заявки
2019.08.09

(51) Int. Cl. ***A61K 9/00*** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/08 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА

(31) **62/717,357**
(32) **2018.08.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/045836**
(87) **WO 2020/033788 2020.02.13**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шарма Ашутош, Дрэнсарт Брайан (US)

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

(57) Настоящее изобретение предусматривает материалы и способы получения фармацевтического состава на основе антитела, обладающего вязкостью, составляющей 10 сП или меньше, включающие замену композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, буфером для диафильтрации, содержащим кальций, при температуре выше 30°C.

202190482 A1

202190482 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567117EA/022

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СОСТАВА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/717357, поданной 10 августа 2018 года, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) под названием "53022A_SeqListing.txt" размером 17859 байт, созданный 8 августа 2019 года.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Следующие заявки настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте: публикация международной заявки на патент № PCT/US2012/049331, поданная 2 августа 2012 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/515191, поданной 4 августа 2011 года; заявка на патент США № 11/410540, поданная 25 апреля 2006 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/782244, поданная 13 марта 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/776847, поданная 24 февраля 2006 года, предварительная заявка на патент США № 60/677583, поданная 3 мая 2005 года, а также заявка на патент США № 11/411003 (по которой выдан патент США № 7592429), поданная 25 апреля 2006 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/792645, поданной 17 апреля 2006 года, предварительной заявки на патент США № 60/782244, поданной 13 марта 2006 года, предварительной заявки на патент США № 60/776847, поданной 24 февраля 2006 года, и предварительной заявки на патент США № 60/677583, поданной 3 мая 2005 года. Следующие заявки также настоящим включены посредством ссылки: заявка на патент США № 12/212327, поданная 17 сентября 2008 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 60/973024, поданной 17 сентября 2007 года; и заявка на патент США № 12/811171, поданная 29 июня 2010 года, которая является заявкой на патент США в национальной фазе согласно статье 35 U.S.C. § 371 на основании международной заявки на патент № PCT/US08/86864, поданной 15 декабря 2008 года, которая испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 61/013917, поданной 14 декабря 2007 года.

Предпосылки изобретения

Высококонцентрированные жидкие составы на основе антитела являются

применимыми для доставки дозы терапевтического средства в меньшем объеме носителя. Однако высококонцентрированные составы на основе белка создают несколько проблем, включая нестабильность из-за образования частиц и повышенную вязкость в результате многочисленных межмолекулярных взаимодействий, связанных с макромолекулярной природой антител. Составы, характеризующиеся высокой вязкостью, также вызывают затруднения при изготовлении, наборе в шприц и введении путем инъекции. Применение силы при манипуляциях с вязкими составами приводит к избыточному образованию пены, что может приводить к денатурации и инактивации активных биологических средств.

Краткое описание настоящего изобретения

В одном аспекте в данном документе описан способ получения фармацевтического состава на основе антитела, характеризующегося вязкостью, составляющей 10 сП или меньше, включающий замену буфера в композиции, содержащей антитело, буфером для диафильтрации, содержащим соль кальция, при температуре выше 30°C. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ромосозумаб, абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб ведотин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаба пэгол, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, муромонаб-CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тоситумомаб, трастузумаб или устекинумаб, ведолизумаб.

В некоторых вариантах осуществления стадию замены осуществляют посредством ультрафильтрации/диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело в концентрации, составляющей по меньшей мере 70 мг/мл, по меньшей мере 71 мг/мл, по меньшей мере 72 мг/мл, по меньшей мере 73 мг/мл, по меньшей мере 74 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл, по меньшей мере 76 мг/мл, по меньшей мере 77 мг/мл, по меньшей мере 78 мг/мл, по меньшей мере 79 мг/мл, по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 81 мг/мл, по меньшей мере 82 мг/мл, по меньшей мере 83 мг/мл, по меньшей мере 84 мг/мл, по меньшей мере 85 мг/мл, по меньшей мере 86 мг/мл, по меньшей мере 87 мг/мл, по меньшей мере 88 мг/мл, по меньшей мере 89 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл, по меньшей мере 91 мг/мл, по меньшей мере 92 мг/мл, по меньшей мере 93 мг/мл, по меньшей мере 94 мг/мл, по меньшей мере 95 мг/мл, по меньшей мере 96 мг/мл, по меньшей мере 97 мг/мл, по меньшей мере 98 мг/мл, по меньшей мере 99 мг/мл, по меньшей мере 100 мг/мл, по меньшей мере 101 мг/мл, по меньшей мере 102 мг/мл, по меньшей мере 103 мг/мл, по меньшей мере 104 мг/мл, по меньшей мере 105 мг/мл, по меньшей мере 106 мг/мл, по меньшей мере 107 мг/мл, по меньшей мере 108 мг/мл, по меньшей мере 109 мг/мл, по меньшей мере 110 мг/мл, по меньшей мере 111 мг/мл, по меньшей мере 112 мг/мл, по меньшей мере 113 мг/мл, по меньшей мере 114 мг/мл, по меньшей мере 115 мг/мл, по меньшей мере 116 мг/мл, по меньшей мере 117 мг/мл, по меньшей мере 118 мг/мл, по меньшей мере 119 мг/мл или по меньшей мере 120 мг/мл. В некоторых вариантах

осуществления композиция содержит антитело в концентрации, значение которой находится в диапазоне 70-210 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело в концентрации, составляющей менее 210 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления стадию замены осуществляют при температуре, составляющей 30-40°С (например, 37°С) или выше 35°С.

В некоторых вариантах осуществления соль кальция представляет собой ацетат кальция.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере 20 мМ (например, приблизительно 23 мМ) ацетата кальция.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации дополнительно содержит полиол (например, сахарозу), необязательно в концентрации, составляющей от приблизительно 1% до приблизительно 15%. В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 7%.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав на основе антитела после стадии замены содержит приблизительно 50 мМ ацетата и приблизительно 12 мМ кальция.

Способы по настоящему изобретению необязательно дополнительно включают стадию фильтрации и/или разделения на аликвоты фармацевтического состава на основе антитела в виде готовой лекарственной формы.

Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "состоящий" следует понимать как открытые термины (т. е. означающие "включающий без ограничения" и допускающие наличие одной или нескольких характеристик или компонентов), если не указано иное. Следует понимать, что хотя различные варианты осуществления в данном описании представлены с использованием формулировки "содержащий", при различных обстоятельствах соответствующий вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок "состоящий из" или "состоящий по сути из". Следует отметить, что формы единственного числа обозначают один или несколько, например, выражение "молекула иммуноглобулина" следует понимать как одну или несколько молекул иммуноглобулина, если в контексте не указано иное. Как таковые, формы единственного числа, выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Кроме того "и/или", используемые в данном документе, следует воспринимать как конкретное указание на каждую из двух указанных характеристик или компонентов с другим или без другого. Таким образом термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А и/или В", в данном документе предусматривает включение "А и В", "А или В", "А" (только) и "В" (только). Подобным образом термин "и/или", используемый во фразе, такой как "А, В и/или С", предусматривает охват каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только) и С (только).

Также следует понимать, что при описании диапазона значений описываемая

характеристика может представлять собой отдельное значение, которое находится в пределах диапазона. Например, "pH от приблизительно pH 4 до приблизительно pH 6" могло бы составлять без ограничения pH 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5 и т. п. и любое значение между такими значениями. Более того, выражение "pH от приблизительно pH 4 до приблизительно pH 6" не следует истолковывать как означающее то, что pH рассматриваемого состава варьируется на 2 единицы pH в диапазоне от pH 4 до pH 6 во время хранения, но следует понимать как то, что значение pH раствора может быть выбрано в этом диапазоне, и при этом pH остается буферизованным при приблизительно данном значении pH.

В любом из диапазонов, описанных в данном документе, предельные значения диапазона включены в диапазон. Однако описание также предусматривает те же диапазоны, из которых исключено более низкое и/или более высокое предельные значения. Дополнительные характеристики и вариации настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из всего объема данной заявки, включающей фигуры и подробное описание, и все такие характеристики предполагаются как аспекты настоящего изобретения. Подобным образом характеристики настоящего изобретения, описанные в данном документе, можно повторно объединять в дополнительные варианты осуществления, которые также предполагаются как аспекты настоящего изобретения, независимо от того, являются ли они комбинацией характеристик, конкретно указанных выше как аспект или вариант осуществления настоящего изобретения. Кроме того, только такие ограничения, которые описаны в данном документе как критичные для настоящего изобретения, следует рассматривать как таковые; варианты настоящего изобретения, лишенные ограничений, которые не были описаны в данном документе как критичные, рассматриваются как аспекты настоящего изобретения.

Если не указано иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell и Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press предоставляют специалисту в данной области техники общий словарь многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Единицы измерения, префиксы и символы указываются в их форме, принятой в Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, обозначающие данный диапазон. Если не указано иное, то все аминокислотные последовательности пишутся слева направо в направлении от аминоконца к карбоксиконцу. Заголовки, предусмотренные в данном документе, не являются ограничениями разнообразных аспектов или аспектов настоящего изобретения, которое может быть получено посредством ссылки на описание в целом.

Все литературные источники, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Краткое описание графических материалов

На фигуре 1 представлен график, демонстрирующий влияние ацетата кальция в различных концентрациях на вязкость композиции на основе антитела. Изображена зависимость вязкости (сП, ось Y) от концентрации антитела (мг/мл, ось X).

На фигуре 2 представлены параметры ультрафильтрации в отсутствие ацетата кальция.

На фигуре 3 представлены параметры ультрафильтрации в присутствии ацетата кальция.

На фигуре 4 представлен график, демонстрирующий влияние температуры на вязкость композиции на основе антитела. Изображена зависимость давления подачи (фунты/кв. дюйм, ось Y) от концентрации ретентата (мг/мл, ось X).

Подробное описание

Настоящее изобретение основано на открытии того, что замена буфера в композиции, содержащей антитело, буфером для диафильтрации, содержащим соль кальция, при температуре выше 30°C приводит к получению фармацевтического состава на основе антитела, характеризующегося вязкостью, составляющей 10 сП или меньше.

Возможность получения состава на основе антител с более высокой концентрацией обеспечивает улучшение режимов дозирования для пациента, уменьшение объемов инъекции, расширение диапазона выбора устройства, а также улучшения, затрагивающие аспекты системы поставок. Многие антитела характеризуются высокой вязкостью при высоких концентрациях, что может ограничивать возможности для обработки и доставки лекарственного средства. В частности, композиции на основе антитела с высокой вязкостью могут создавать проблемы на конечной стадии процесса ультрафильтрации/диафильтрации лекарственного вещества за счет высокой длительности обработки, высоких значений давления, больших значений площади мембраны, необходимой для обработки, и потенциально низких показателей выхода продукта. Как описано в данном документе, комбинированное применение повышенной температуры и соли кальция (например, ацетата кальция) является эффективным для снижения вязкости композиции, учитывая тот факт, что растворимость соли кальция понижается при повышении температуры.

Используемые в данном документе термины "ультрафильтрация" или "UF" относятся к любой методике, при которой раствор или суспензию подвергают контакту с мембраной (например, полупроницаемой мембраной) для отделения продукта (например, белка) от других материалов в растворе или суспензии. Мембрана для ультрафильтрации, например, задерживает молекулы, размер которых превышает размер пор мембраны, в то время как молекулы меньшего размера, такие как соли, растворители и вода свободно проходят через мембрану. Раствор, задерживаемый мембраной, обозначают термином "концентрат" или "ретентат", а раствор, который проходит через мембрану, обозначают

термином "фильтрат" или "пермеат". Ультрафильтрацию можно применять для повышения концентрации макромолекул в растворе или суспензии. В одном аспекте ультрафильтрацию применяют для повышения концентрации белка в растворе.

Мембранные фильтры, такие как мембраны для ультрафильтрации по настоящему изобретению, могут иметь размер пор, составляющий 0,001-0,1 микрон. В некоторых вариантах осуществления мембранный фильтр имеет размер пор, составляющий 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035, 0,040, 0,045, 0,050, 0,055, 0,060, 0,065, 0,070, 0,075, 0,080, 0,085, 0,090, 0,095 или 0,100 микрон. В некоторых вариантах осуществления мембранные фильтры по настоящему изобретению характеризуются значением отсечки по молекулярному весу, составляющим от 15 килодальтон (кДа) до 50 кДа или больше. Например, в некоторых вариантах осуществления мембранный фильтр характеризуется значением отсечки по молекулярному весу, составляющим 15 кДа, 20 кДа, 25 кДа, 30 кДа, 35 кДа, 40 кДа, 45 кДа, или 50 кДа, или любое промежуточное значение. В некоторых вариантах осуществления значение отсечки по молекулярному весу мембраны составляет 30 кДа.

Используемый в данном документе термин "диафильтрация" или "DF" применяют для обозначения, например, применения мембраны для ультрафильтрации для удаления, замены или снижения концентрации солей или растворителей в растворах или смесях, содержащих белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или другие биомолекулы. Осуществление диафильтрации может приводить или не приводить к повышению концентрации задерживаемых компонентов, в том числе белков. Например, при осуществлении непрерывной диафильтрации растворитель непрерывно добавляют к ретентату с той же скоростью, с которой получают фильтрат. В данном случае объем ретентата и концентрация задерживаемых компонентов не изменяются в ходе процесса. С другой стороны, при прерывистой диафильтрации или диафильтрации с использованием последовательных разведений за стадией ультрафильтрации следует добавление растворителя к ретентату; если объем растворителя, добавляемый к ретентату, не равен или не превышает объем полученного фильтрата, то задерживаемые компоненты будут иметь высокую концентрацию. Диафильтрацию можно применять для изменения значения pH, ионной силы, состава соли, состава буфера или других свойств раствора или суспензии макромолекул.

Используемые в данном документе термины "ультрафильтрация/диафильтрация" или "UF/DF" относятся к любому способу, методике или комбинации методик, в ходе которых осуществляется ультрафильтрация и/или диафильтрация либо последовательно, либо одновременно.

В некоторых вариантах осуществления вязкость композиции, содержащей антитело, измеряют до стадии замены буфера, и вязкость полученного состава измеряют после замены буфера в исходной композиции на буфер для диафильтрации, содержащий соль кальция, при температуре выше 30°C. Способы измерения вязкости широко известны из уровня техники и включают, например, использование капиллярного вискозиметра или

реометра с системой "конус-плоскость". Можно применять любые способы, при условии, что тот же способ применяется для сравнения исходной композиции и полученного состава.

Используемый в данном документе термин "вязкость" относится к "абсолютной вязкости". Абсолютная вязкость, иногда называемая динамической или простой вязкостью, является произведением кинематической вязкости и плотности жидкости: абсолютная вязкость=кинематическая вязкость х плотность. Размерность кинематической вязкости представляет собой L^2/T, где L представляет собой длину, и T представляет собой время. Обычно кинематическая вязкость выражается в сантистоксах (сСт). Единицей измерения кинематической вязкости в системе СИ является $мм^2/с$, что составляет 1 сСт. Абсолютная вязкость выражается в сантипуазах (сП). Единицей измерения абсолютной вязкости в системе СИ является миллипаскаль-секунда (мПа·с), где 1 сП=1 мПа·с.

Измерения вязкости можно осуществлять при температуре хранения или введения, например, 2-8°C или 25°C (комнатная температура). В некоторых вариантах осуществления абсолютная вязкость полученной фармацевтической композиции при температуре хранения и/или введения составляет 15 сП или меньше, 14 сП или меньше, 13 сП или меньше, 12 сП или меньше, 11 сП или меньше, 10 сП или меньше, 9 сП или меньше, 8 сП или меньше, 7 сП или меньше, 6 сП или меньше, 5 сП или меньше или 4 сП или меньше.

"Буфер для диафильтрации" представляет собой буфер, который не содержит в своем составе антитело, но применяется для получения состава, содержащего антитело. Буфер для диафильтрации содержит соль кальция. Иллюстративные соли кальция включают без ограничения ацетат кальция, карбонат кальция, цитрат кальция, глюконат кальция, лактат кальция, глутамат кальция, сукцинат кальция и хлорид кальция**.** В некоторых вариантах осуществления соль кальция присутствует в буфере для диафильтрации в концентрации, находящейся в диапазоне 5-150 мМ. В некоторых вариантах осуществления соль кальция присутствует в буфере для диафильтрации в концентрации, находящейся в диапазоне 10-30 мМ. В некоторых вариантах осуществления соль кальция присутствует в буфере для диафильтрации в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 11 мМ, по меньшей мере 12 мМ, по меньшей мере 13 мМ, по меньшей мере 14 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 16 мМ, по меньшей мере 17 мМ, по меньшей мере 18 мМ, по меньшей мере 19 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 21 мМ, по меньшей мере 22 мМ, по меньшей мере 23 мМ, по меньшей мере 24 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 26 мМ, по меньшей мере 27 мМ, по меньшей мере 28 мМ, по меньшей мере 29 мМ или по меньшей мере 30 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация соли кальция в буфере для диафильтрации составляет не более чем приблизительно 20 мМ, не более чем приблизительно 21 мМ, не более чем приблизительно 22 мМ, не более чем приблизительно 23 мМ, не более чем приблизительно 24 мМ, не более чем

приблизительно 25 мМ, не более чем приблизительно 26 мМ, не более чем приблизительно 27 мМ, не более чем приблизительно 28 мМ, не более чем приблизительно 29 мМ или не более чем приблизительно 30 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 0,5 мМ до приблизительно 30 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 30 мМ или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления соль кальция присутствует в буфере для диафильтрации в концентрации, которая снижает вязкость композиции на основе антитела, полученной в результате стадии замены буфера, раскрытой в данном документе, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или больше по сравнению с композицией на основе антитела до замены буфера на буфер для диафильтрации, содержащий соль кальция, при температуре выше 30°C, или при которой достигается значение вязкости, составляющее 10 сП или меньше, 9 сП или меньше, 8 сП или меньше, 7 сП или меньше, 6 сП или меньше или 5 сП или меньше.

Во всех диапазонах, описанных в данном документе, концентрация катиона, аниона или соли, описанная в данном документе, относится к буферу для диафильтрации. В любом из диапазонов, описанных в данном документе, предельные значения диапазона включены в диапазон. Однако описание также предусматривает те же диапазоны, из которых исключено более низкое и/или более высокое предельные значения.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации, описанный в данном документе, дополнительно содержит, в дополнение к соли кальция, буфер (например, ацетатный буфер) в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 5 мМ, по меньшей мере приблизительно 6 мМ, по меньшей мере приблизительно 7 мМ, по меньшей мере приблизительно 8 мМ, по меньшей мере приблизительно 9 мМ, по меньшей мере приблизительно 10 мМ или по меньшей мере приблизительно 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация составляет не более чем приблизительно 10 мМ, не более чем приблизительно 15 мМ, не более чем приблизительно 20 мМ, не более чем приблизительно 25 мМ, не более чем приблизительно 30 мМ, не более чем приблизительно 35 мМ, не более чем приблизительно 40 мМ, не более чем приблизительно 45 мМ или не более чем приблизительно 50 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ. Буфер предпочтительно добавляют до достижения концентрации, при которой поддерживается значение pH, составляющее около 5-6, или 5-5,5, или 4,5-5,5. Если соль кальция в составе представляет собой ацетат кальция, то в некоторых вариантах осуществления общая концентрация ацетата составляет от приблизительно 10 мМ до

приблизительно 60 мМ или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ.

В некоторых аспектах буфер для диафильтрации предусматривает общую концентрацию ацетата, которая составляет по меньшей мере приблизительно 10 мМ, по меньшей мере приблизительно 15 мМ, по меньшей мере приблизительно 20 мМ, по меньшей мере приблизительно 25 мМ, по меньшей мере приблизительно 30 мМ, по меньшей мере приблизительно 35 мМ, по меньшей мере приблизительно 40 мМ, по меньшей мере приблизительно 45 мМ или по меньшей мере приблизительно 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация ацетата составляет не более чем приблизительно 30 мМ, не более чем приблизительно 35 мМ, не более чем приблизительно 40 мМ, не более чем приблизительно 45 мМ, не более чем приблизительно 50 мМ, не более чем приблизительно 55 мМ, не более чем приблизительно 60 мМ, не более чем приблизительно 65 мМ, не более чем приблизительно 70 мМ, не более чем приблизительно 75 мМ, не более чем приблизительно 80 мМ, не более чем приблизительно 85 мМ или не более чем приблизительно 90 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 20 мМ до приблизительно 40 мМ, от приблизительно 30 мМ до приблизительно 50 мМ или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 75 мМ. В качестве неограничивающего примера, раствор, содержащий 10 мМ ацетата кальция, будет содержать 20 мМ аниона ацетата и 10 мМ катиона кальция по причине двухвалентной природы катиона кальция, тогда как раствор, содержащий 10 мМ ацетата натрия, будет содержать 10 мМ катиона натрия и 10 мМ аниона ацетата.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит глутаматный буфер или сукцинатный буфер в концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 5 мМ, по меньшей мере приблизительно 6 мМ, по меньшей мере приблизительно 7 мМ, по меньшей мере приблизительно 8 мМ, по меньшей мере приблизительно 9 мМ, по меньшей мере приблизительно 10 мМ или по меньшей мере приблизительно 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация составляет не более чем приблизительно 10 мМ, не более чем приблизительно 15 мМ, не более чем приблизительно 20 мМ, не более чем приблизительно 25 мМ, не более чем приблизительно 30 мМ, не более чем приблизительно 35 мМ, не более чем приблизительно 40 мМ, не более чем приблизительно 45 мМ или не более чем приблизительно 50 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 5 мМ до приблизительно 15 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 10 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 30 мМ, или от приблизительно 20 мМ до приблизительно 25 мМ. Буфер предпочтительно добавляют до достижения концентрации, при которой поддерживается значение pH, составляющее около 5-6, или 5-5,5, или 4,5-5,5.

В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ионов (катионов и

анионов) в буфере для диафильтрации составляет по меньшей мере приблизительно 10 мМ, по меньшей мере приблизительно 15 мМ, по меньшей мере приблизительно 20 мМ, по меньшей мере приблизительно 25 мМ, по меньшей мере приблизительно 30 мМ, по меньшей мере приблизительно 35 мМ, по меньшей мере приблизительно 40 мМ, по меньшей мере приблизительно 45 мМ, по меньшей мере приблизительно 50 мМ, по меньшей мере приблизительно 55 мМ, по меньшей мере приблизительно 60 мМ, по меньшей мере приблизительно 65 мМ, по меньшей мере приблизительно 70 мМ, по меньшей мере приблизительно 75 мМ, по меньшей мере приблизительно 80 мМ или по меньшей мере приблизительно 85 мМ. В некоторых вариантах осуществления общая концентрация ионов составляет не более чем приблизительно 30 мМ, не более чем приблизительно 35 мМ, не более чем приблизительно 40 мМ, не более чем приблизительно 45 мМ, не более чем приблизительно 50 мМ, не более чем приблизительно 55 мМ, не более чем приблизительно 60 мМ, не более чем приблизительно 65 мМ, не более чем приблизительно 70 мМ, не более чем приблизительно 75 мМ, не более чем приблизительно 80 мМ, не более чем приблизительно 85 мМ, не более чем приблизительно 90 мМ, не более чем приблизительно 95 мМ, не более чем приблизительно 100 мМ, не более чем приблизительно 110 мМ, не более чем приблизительно 120 мМ, не более чем приблизительно 130 мМ, не более чем приблизительно 140 мМ, не более чем приблизительно 150 мМ, не более чем приблизительно 160 мМ, не более чем приблизительно 170 мМ, не более чем приблизительно 180 мМ, не более чем приблизительно 190 мМ или не более чем приблизительно 200 мМ. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 30 мМ до приблизительно 60 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 70 мМ, или от приблизительно 30 мМ до приблизительно 80 мМ, или от приблизительно 40 мМ до приблизительно 150 мМ, или от приблизительно 50 мМ до приблизительно 150 мМ. В качестве неограничивающего примера раствор, содержащий 10 мМ ацетата кальция, будет иметь общую концентрацию ионов, составляющую 30 мМ (10 мМ катионов и 20 мМ анионов).

В различных вариантах осуществления композиция на основе антитела подвергается замене буфера на буфер для диафильтрации при температуре выше 30°C. В некоторых вариантах осуществления замену буфера осуществляют при температуре, составляющей 30-40°C. В некоторых вариантах осуществления замену буфера осуществляют при температуре выше 35°C. В некоторых вариантах осуществления замену буфера осуществляют при 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C или 40°C. В некоторых вариантах осуществления замену буфера осуществляют при 37°C.

Буфер для диафильтрации, описанный в данном документе, необязательно содержит по меньшей мере один полиол. Полиолы охватывают класс вспомогательных веществ, который включает сахара (например, маннит, сахарозу или сорбит) и другие многоатомные спирты (например, глицерол и пропиленгликоль). Полимер

полиэтиленгликоль (PEG) включен в эту категорию. Полиолы обычно применяют в качестве стабилизирующих вспомогательных веществ и/или изотонических средств как в жидких, так и в лиофилизированных белковых составах для парентерального введения. Полиолы способны защищать белки как от физических, так и от химических путей деградации.

Иллюстративные полиолы включают без ограничения сахарозу, трегалозу, маннозу, мальтозу, лактозу, глюкозу, рафинозу, целлобиозу, гентиобиозу, изомальтозу, арабинозу, глюкозамин, фруктозу, маннит, сорбит, глицин, аргинин-HCL, полигидроксисоединения (включая, например, полисахариды, такие как декстран, крахмал, гидроксиэтилкрахмал, циклодекстрины, каптизол, N-метилпироллиден, целлюлоза и гиалуроновая кислота) и хлорид натрия (Carpenter et al., Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)).

Дополнительные полиолы включают без ограничения пропиленгликоль, глицерин (глицерол), треозу, треит, эритрозу, эритрит, рибозу, арабинозу, арабит, ликсозу, мальтит, сорбит, сорбозу, глюкозу, маннозу, маннит, левулозу, декстрозу, мальтозу, трегалозу, фруктозу, ксилит, инозит, галактозу, ксилозу, фруктозу, сахарозу, 1,2,6-гексантриол и т. п. Сахара более высокого порядка включают декстран, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Восстанавливающие сахара, такие как фруктоза, мальтоза или галактоза, окисляются быстрее, чем невосстанавливающие сахара. Дополнительными примерами сахарных спиртов являются глюцит, мальтит, лактит или изомальтулоза. Примеры восстанавливающих сахаров включают глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изомальтулозу и лактулозу. Примеры невосстанавливающих сахаров включают невосстанавливающие гликозиды полигидроксисоединений, выбранные из сахарных спиртов и других многоатомных спиртов с неразветвленной цепью. Моногликозиды включают соединения, полученные посредством восстановления дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол выбран из группы, состоящей из моносахарида, дисахарида, циклического полисахарида, сахарного спирта, линейного разветвленного декстрана и линейного неразветвленного декстрана или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол представляет собой дисахарид, выбранный из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита и сорбита или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей от приблизительно 0% до приблизительно 40% вес/объем, или от приблизительно 0% до приблизительно 20% вес/объем, или от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей

мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30 или по меньшей мере 40% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей от приблизительно 1, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14% до приблизительно 15% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/объем. В еще одном дополнительном варианте осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, приблизительно 10%, приблизительно 10,5%, приблизительно 11%, приблизительно 11,5% или приблизительно 12% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере один полиол (например, сахарид) в концентрации, составляющей от приблизительно 9% до приблизительно 12% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол (например, сахарид) содержится в буфере для диафильтрации в концентрации, составляющей приблизительно 9% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один полиол выбран из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита и сорбита или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полиол представляет собой сахарозу и присутствует в буфере для диафильтрации в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 9% вес/объем.

В некоторых вариантах осуществления буфер для диафильтрации содержит 20 мМ ацетата кальция, 7% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления pH буфера для диафильтрации находится в диапазоне, составляющем 4-6. В некоторых вариантах осуществления pH буфера для диафильтрации составляет 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6. В некоторых вариантах осуществления pH буфера для диафильтрации составляет 5,1.

Ультрафильтрация/диафильтрация

При проведении ультрафильтрации/диафильтрации (также как правило называемой в данном документе UF/DF) селективно используются проницаемые (пористые) мембранные фильтры для разделения компонентов растворов и суспензий на основании их молекулярного размера. Мембрана удерживает молекулы, размер которых превышает размер пор мембраны, в то время как молекулы меньшего размера, такие как соли, растворители и вода, которые способны проникать через мембрану, свободно проходят через мембрану. Раствор, задерживаемый мембраной, известен как концентрат или

ретентат. Раствор, который проходит через мембрану, известен как фильтрат или пермеат. Одним параметром для выбора мембраны для концентрирования являются характеристики ее задерживающей способности по отношению к образцу, подлежащему концентрированию. Как правило, значение отсечки по молекулярному весу (MWCO) мембраны должно составлять от 1/3 до 1/6 молекулярного веса молекулы, подлежащей задерживанию. Это необходимо для обеспечения полного задерживания. Чем ближе значение MWCO к таковому образца, тем выше риск потери некоторого небольшого количества продукта в ходе концентрирования. Примеры мембран, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению, включают мембрану Omega™ PES (значение MWCO составляет 30 кДа, т. е. молекулы размером более 30 кДа задерживаются мембраной и молекулам размером менее 30 кДа обеспечивается прохождение к стороне мембраны, с которой находится фильтрат) (Pall Corp., Порт-Вашингтон, Нью-Йорк); регенерированную целлюлозную мембрану Pellicon™ 30 кДа (Millipore Sigma); управляемую с помощью шприца установку для фильтрации Millex®.-GV, PVDF 0,22 мкм (Millipore Corp., Биллерика, Массачусетс); управляемую с помощью шприца установку для фильтрации Millex®.-GP, PES 0,22 мкм; установку для фильтрации Sterivex® 0,22 мкм (Millipore Corp., Биллерика, Массачусетс); и концентраторы Vivaspin (значение MWCO составляет 10 кДа, PES; значение MWCO составляет 3 кДа, PES) (Sartorius Corp., Эджвуд, Нью-Йорк).

Существуют две формы UF/DF, включая UF/DF в прерывистом режиме и UF/DF в непрерывном режиме. Способы по настоящему изобретению можно осуществлять в соответствии с любым из режимов.

Непрерывная UF/DF (также называемая UF/DF с постоянным объемом) подразумевает вымывание исходных буферных солей (или других низкомолекулярных соединений) из ретентата (образце) посредством добавления воды или нового буфера к ретентату с той же скоростью, с которой получают фильтрат. В результате объем ретентата и концентрация продукта не изменяются в ходе процесса UF/DF. Количество удаленной соли связано с объемом полученного фильтрата и зависит от объема ретентата. В отношении объема полученного фильтрата обычно применяют термины "объемы диафильтрации". Один объем диафильтрации (DV) представляет собой объем ретентата в начале диафильтрации. Для осуществления непрерывной диафильтрации жидкость добавляют с той же скоростью, с которой получают фильтрат. Когда объем собранного фильтрата становится равен исходному объему ретентата, считают, что был обработан 1 DV.

Прерывистая UF/DF включает два разных способа, прерывистую последовательную UF/DF и прерывистую UF/DF с уменьшением объема. Прерывистая UF/DF с помощью последовательных разведений подразумевает сначала разбавление образца водой до предварительно определенного объема. Разбавленный образец затем концентрируют обратно до его исходного объема с помощью UF. Прерывистая UF/DF с уменьшением объема подразумевает сначала концентрирование образца до

предварительно определенного объема, затем разбавление образца обратно до его исходного объема с помощью воды или заменяющего буфера. Как и в случае с непрерывной UF/DF, процесс повторяют, пока уровень нежелательных растворенных веществ, например, ионных вспомогательных веществ, не будет понижен до нуля.

UF/DF можно осуществлять в соответствии с общепринятыми методиками, известными из уровня техники, с использованием воды, например, WFI, в качестве среды для UF/DF (например, Industrial Ultrafiltration Design and Application of Diafiltration Processes, Beaton & Klinkowski, J. Separ. Proc. Technol., 4(2) 1-10 (1983)). Примеры коммерчески доступного оборудования для осуществления UF/DF включают систему для TFF Millipore Labscale™ (Millipore), LV Centramate™, лабораторную систему для фильтрации в тангенциальном потоке (Pall Corporation), систему UniFlux (GE Healthcare), FlexAct® UD (Sartorius Stedim Biotech), Mobius® FlexReady TFF (EMD Millipore), Akta™ Readyflux (GE Healthcare), систему одноразового использования для TFF Allegro™ (Pall Corporation) и установки из нержавеющей стали, такие как системы для TFF Cogent.

Стадию замены буфера на буфер для диафильтрации можно осуществлять любое количество раз, в зависимости от белка в растворе, где одна стадия диафильтрации эквивалентна одной замене общего объема. В одном варианте осуществления процесс диафильтрации осуществляют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или столько раз, сколько считается необходимым для достижения требуемого результата. Один раунд или стадия диафильтрации считаются выполненными, если объем буфера для диафильтрации, который был добавлен к ретентату, равен исходному объему композиции на основе антитела.

В различных вариантах осуществления полученный состав, подвергнутый диафильтрации после стадии замены, содержит приблизительно 50 мМ ацетата и приблизительно 12 мМ кальция.

Способы по настоящему изобретению также предусматривают способы концентрирования антигенсвязывающего белка до высоких уровней без повышения вязкости полученного состава, подвергнутого диафильтрации. Концентрация антигенсвязывающего белка в водном составе, полученном с применением способов по настоящему изобретению, может иметь любое значение в соответствии с требуемой концентрацией. Например, концентрация антигенсвязывающего белка в композиции, полученной в соответствии со способами, описанными в данном документе, составляет по меньшей мере приблизительно 70 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 71 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 72 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 73 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 74 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 75 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 76 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 77 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 78 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 79 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 80 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 81 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 82 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 83 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 84 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 85 мг/мл, по

меньшей мере приблизительно 86 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 87 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 88 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 89 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 90 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 91 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 92 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 93 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 94 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 95 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 96 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 97 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 98 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 99 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 100 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 101 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 102 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 103 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 104 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 105 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 106 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 107 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 108 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 109 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 110 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 111 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 112 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 113 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 114 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 115 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 116 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 117 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 118 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 119 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 120 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 121 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 122 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 123 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 124 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 125 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 126 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 127 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 128 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 129 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 130 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 131 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 132 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 132 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 133 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 134 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 135 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 136 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 137 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 138 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 139 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 140 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 141 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 142 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 143 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 144 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 145 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 146 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 147 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 148 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 149 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 150 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 151 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 152 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 153 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 154 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 155 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 156 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 157 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 158 мг/мл, по меньшей мере приблизительно 159 мг/мл, или по меньшей мере приблизительно 160 мг/мл и может находиться в диапазоне, не превышающем, например, приблизительно 300 мг/мл, приблизительно 290 мг/мл, приблизительно 280 мг/мл, приблизительно 270 мг/мл,

приблизительно 260 мг/мл, приблизительно 250 мг/мл, приблизительно 240 мг/мл, приблизительно 230 мг/мл, приблизительно 220 мг/мл, приблизительно 210 мг/мл, приблизительно 200 мг/мл, приблизительно 190 мг/мл, приблизительно 180 мг/мл или приблизительно 170 мг/мл. Предусмотрен любой диапазон, характеризующийся комбинацией вышеуказанных предельных значений, включая без ограничения от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 210 мг/мл, от приблизительно 70 мг/мл до приблизительно 160 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 250 мг/мл, от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 200 мг/мл или от приблизительно 100 мг/мл до приблизительно 180 мг/мл.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий белок" означает белок, который специфически связывается с конкретным антигеном. Примеры антигенсвязывающих белков включают без ограничения антитела, пептитела, фрагменты антител, конструкции на основе антител, слитые белки и антигенные рецепторы, в том числе химерные антигенные рецепторы (CAR). Термин охватывает интактные антитела, которые содержат по меньшей мере две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи, а также их производные, варианты, фрагменты и мутации. Антигенсвязывающий белок также включает доменные антитела, такие как наноантитела и scFv, как дополнительно описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему вариабельные и константные области. Антитело содержит вариабельную область и константную область. В форматах IgG вариабельная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы. Вариабельная область состоит из N-концевых областей каждой легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из С-концевых частей каждой из тяжелых и легких цепей. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

Общая структура и свойства CDR антител были описаны в данной области техники. Вкратце, в остове антитела CDR встроены в каркас вариабельной области тяжелой и легкой цепей, где они составляют области, главным образом отвечающие за связывание и распознавание антигена. Вариабельная область содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Бетесда, Мэриленд; см. также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в

пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 по Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

Человеческие легкие цепи классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эпсилон-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эпсилон-, гамма- или мю-типа. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитела подкласса IgG1 являются особенно восприимчивыми к восстановлению дисульфидных связей и, как следствие, представляют собой один предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения.

Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая в значительное степени сходна с встречающимся в природе антителом, продуцируемым млекопитающим, например, мышью, кроликом, козой, лошадью, курицей, хомяком, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело человека и т. п. В определенных аспектах моноклональное антитело представляет собой человеческое антитело. В определенных аспектах моноклональное антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" используется в данном документе для обозначения антитела, содержащего константные домены от одного вида и вариабельные домены от второго или, в более общем случае, содержащего фрагменты аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антител относится к антителам, содержащим по меньшей мере области CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более сходные с таковыми у настоящих человеческих антител, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от человеческого, такого как мышиное антитело, на человеческое антитело. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены для того, чтобы сделать последовательность, отличную от

человеческой, более сходной с человеческой последовательностью.

Способ по настоящему изобретению также подходит для получения состава, содержащего антигенсвязывающие белки, например, фрагменты антитела, такие как scFv, Fab и VHH/VH, которые сохраняют полную антигенсвязывающую способность. Как scFv, так и Fab являются широко применяемыми фрагментами, которые можно легко получать в прокариотических хозяевах. Другие белковые продукты на основе антитела включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетратела, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризующимися доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VH из тяжелой цепи Ab верблюдовых, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который чаще всего используется для создания новых форматов антитела, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный вариабельный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (VH- и VL-домен), связанные с помощью пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептитело или продукт слияния пептида и Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела хорошо описаны в данной области техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой scFv, Fab VHH/VH, Fv-фрагмент, ds-scFv, scFab, димерное антитело, мультимерное антитело (например, диатело, триатело, тетратело), мини-Ab, пептитело, VHH/VH тяжелой цепи антитела верблюдовых, sdAb, биспецифическое или триспецифическое антитело, BsIgG, присоединенный IgG, фрагмент BsAb, биспецифический слитый белок или конъюгат BsAb.

Антигенсвязывающий белок может быть в мономерной форме или полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более различных фрагментов антигенсвязывающих областей, антитело считается биспецифическим, триспецифическим, или полиспецифическим, или бивалентным, тривалентным или поливалентным в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом.

Преимущественно, способы не ограничены специфичностью антитела к антигену. Соответственно, антитело (или фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела) обладает любой специфичностью связывания с фактически любым антигеном. В иллюстративных аспектах антитело связывается с гормоном, фактором роста, цитокином, рецептором на клеточной поверхности или любым его лигандом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой ромосозумаб, абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб ведотин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаба пэгол, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб,

муромонаб-CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тоситумомаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб или биоаналог любого из вышеуказанных антител.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из муромонаба-CD3 (продукта, представленного на рынке под торговым названием Orthoclone Okt3®), абциксимаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Reopro®), ритуксимаба (продукта, представленного на рынке под торговыми названиями MabThera®, Rituxan®) (патент США № 5843439), базиликсимаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Simulect®), даклизумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Zenapax®), паливизумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Synagis®), инфликсимаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Remicade®), трастузумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Herceptin®), алемтузумаба (продукта, представленного на рынке под торговыми названиями MabCampath®, Campath-1H®), адалимумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Humira®), тоситумомаб-I131 (продукта, представленного на рынке под торговым названием Bexxar®), эфализумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Raptiva®), цетуксимаба (продукта, представленного под торговым названием Erbitux®), I'ибритумомаба тиуксетана (продукта, представленного на рынке под торговым названием Zevalin®), I'омализумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Xolair®), бевацизумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Avastin®), натализумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Tysabri®), ранибизумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Lucentis®), панитумумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Vectibix®), I'экулизумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Soliris®), цертолизумаба пэгола (продукта, представленного на рынке под торговым названием Cimzia®), голимумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Simponi®), канакинумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Ilaris®), катумаксомаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Removab®), устекинумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Stelara®), тоцилизумаба (продукта, представленного на рынке под торговыми названиями RoActemra®, Actemra®), офатумумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Arzerra®), деносумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Prolia®), белимумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Benlysta®), раксибакумаба, ипилимумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Yervoy®) и пертузумаба (продукта, представленного на рынке под торговым названием Perjeta®).

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к склеростину. Термином "антитело к склеростину" или "антитело, которое связывается со склеростином", обозначают антитело, которое связывается со склеростином под SEQ ID

NO: 1 или его частями. Рекомбинантный человеческий склеростин/SOST является коммерчески доступным, например, в R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота, США; № по каталогу 2006 года 1406-ST-025). Патенты США №№ 6395511 и 6803453, а также публикации заявок на патент США №№ 2004/0009535 и 2005/0106683 (включенные в данный документ посредством ссылки) в целом относятся к антителам к склеростину. Примеры антител к склеростину, подходящих для применения в контексте настоящего изобретения, также описаны в публикациях заявок на патент США №№ 2007/0110747 и 2007/0072797, которые включены в данный документ посредством ссылки. Дополнительную информацию, относящуюся к материалам и способам получения антител к склеростину, можно найти в публикации заявки на патент США № 20040158045 (включенной в данный документ посредством ссылки).

Используемое в данном документе выражение "специфически связывается" означает, что антитело преимущественно связывается с антигеном, а не с другими белками. В некоторых вариантах осуществления выражение "специфически связывается" означает, что антитело характеризуется более высокой аффинностью в отношении антигена, чем в отношении других белков.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело связывается со склеростином под SEQ ID NO: 1 или его встречающимся в природе вариантом с аффинностью (Kd), меньшей или равной 1×10^{-7} М, меньшей или равной 1×10^{-8} М, меньшей или равной 1×10^{-9} М, меньшей или равной 1×10^{-10} М, меньшей или равной 1×10^{-11} М или меньшей или равной 1×10^{-12} М. Аффинность определяют с использованием ряда методик, примером которых является анализ аффинности ELISA. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью анализа BIAcore. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью кинетического способа. В различных вариантах осуществления аффинность определяют с помощью способа с использованием равновесия/раствора. В публикации заявки на патент США № 2007/0110747 (раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки) содержится дополнительное описание анализов аффинности, подходящих для определения аффинности (Kd) антитела в отношении склеростина.

В различных аспектах антитело содержит по меньшей мере одну последовательность CDR, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с CDR, выбранной из CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где CDR-H1 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, CDR-H2 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3, CDR-H3 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, CDR-L1 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 5, CDR-L2 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6, и CDR-L3 имеет последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7. Антитело к склеростину в различных аспектах содержит две CDR или шесть CDR.

В предпочтительном варианте осуществления антитело к склеростину содержит группу из следующих шести CDR: CDR-H1 под SEQ ID NO: 2, CDR-H2 под SEQ ID NO: 3, CDR-H3 под SEQ ID NO: 4, CDR-L1 под SEQ ID NO: 5, CDR-L2 под SEQ ID NO: 6 и CDR-L3 под SEQ ID NO: 7.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 8, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 9. В различных аспектах различие в последовательности по сравнению с SEQ ID NO: 8 или 9 лежит вне области CDR в соответствующих последовательностях. В некоторых или любых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 9.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело к склеростину содержит всю тяжелую цепь или ее часть (например, две тяжелых цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 11, и всю легкую цепь или ее часть (например, две легких цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 10.

В некоторых или любых вариантах осуществления антитело к склеростину содержит всю тяжелую цепь или ее часть (например, две тяжелых цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 13, и всю легкую цепь или ее часть (например, две легких цепи), содержащие аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 75% идентичностью (например, по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичностью) с аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 12.

Примеры других антител к склеростину включают без ограничения антитела к склеростину, раскрытые в публикациях международных заявок на патент №№ WO

2008/092894, WO 2008/115732, WO 2009/056634, WO 2009/047356, WO 2010/100200, WO 2010/100179, WO 2010/115932 и WO 2010/130830 (каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что некоторые белки, такие как антитела, могут подвергаться ряду посттрансляционных модификаций. Тип и степень этих модификаций часто зависят от линии клетки-хозяина, используемой для экспрессии белка, а также условий культивирования. Такие модификации могут включать вариации в гликозилировании, окислении метионина, образовании дикетопиперизина, изомеризации аспартата и дезамидировании аспарагина. Частой модификацией является потеря карбокси-концевого основного остатка (такого как лизин или аргинин) вследствие действия карбоксипептидаз (как описано в Harris, RJ. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995).

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983], полностью включен посредством ссылки), ацетилирование N-концевой аминогруппы и амидирование любой С-концевой карбоксильной группы.

Фармацевтическая композиция, содержащая одно или несколько антител, описанных в данном документе, может быть помещена в контейнеры (например, флаконы или шприцы) вместе с упаковочным материалом, который предусматривает инструкции в отношении применения таких фармацевтических композиций. Как правило, такие инструкции будут включать конкретную формулировку, описывающую концентрацию антитела, а также в определенных вариантах осуществления относительные количества вспомогательных ингредиентов или разбавителей (например, воды, солевого раствора или PBS), которые могут потребоваться для восстановления фармацевтической композиции.

Пример

В данном примере описывается иллюстративный способ очистки антитела, в ходе которого применяют замену буфера при повышенной температуре (например, посредством стадии ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF)) для концентрирования и замены буфера антитела на буфер для диафильтрации, содержащий 20 мМ ацетата кальция, 7% сахарозы, pH 5,1, с получением конечной фармацевтической композиции, содержащей антитело в концентрации, составляющей 120 г/л. Результатом применения этого способа является возможность восстанавливать белок с высокой концентрацией из сверхконцентрированного состояния с использованием как высокой температуры (например, 37°C), так и соли кальция (например, ацетата кальция). Ацетат кальция обладает свойством снижать растворимость при повышении температуры (см., например, Apelblat, A. and Manzurola, E.; J. Chem. Thermodynamics, 1999, 31, 1347-1357).

Данная обратная зависимость между растворимостью и температурой позволяет предположить, что применение повышенной температуры в ходе замены буфера

(например, UF/DF) на состав, содержащий ацетат кальция, может привести к аберрантному осаждению или другим потенциально негативным побочным эффектам. Другими словами, повышение температуры составов, содержащих ацетат кальция, будет приводить к снижению растворимости буферной соли. В то время как значения целевой концентрации ацетата кальция ($Ca(Ac)_2$) являются относительно низкими в буфере для диафильтрации, ~ 20 мМ $Ca(Ac)^2$, локальная концентрация соли на поверхности мембраны для ультрафильтрации могла быть более высокой в ходе процесса UF, особенно в ходе стадии сверхконцентрирования. Данные высокие значения локальной концентрации $Ca(Ac)_2$ наряду с повышенной температурой и очень высокими значениями концентрации белка приводят к тому, что способ ультрафильтрации способен обеспечить высокий показатель выхода продукта.

На фигуре 1 показано действие ацетата кальция на вязкость сверхконцентрированного материала. Добавления кальция, составляющие 10-23 мМ, снижали вязкость в значительной степени. Это также продемонстрировано с помощью параметров UF/DF на фигурах 2 и 3, где Cwall (максимальная концентрация белка на поверхности мембраны) повышается от 186 мг/мл до 220 мг/мл при добавлении кальция.

Действие температуры на вязкость показано на фигуре 4. Повышение температуры приводило к снижению вязкости и давления подачи при заданных условиях осуществления UF/DF.

Интересно, что концентрация кальция в пуле UF не соответствовала буферу для диафильтрации (DF) после сверхконцентрирования. Диафильтрацию осуществляют при концентрации, составляющей 55 г/л, осуществляя превращение буфера в 20 мМ ацетат кальция, 7% сахарозу, pH 5,1, с использованием более 10 диаобъемов (DV). Сверхконцентрирование приводит к повышению концентрации белка в 3,3 раза (до 180 г/л). Если осуществляли концентрирование кальция в одинаковой степени, то концентрация буфера для DF, содержащего 20 мМ кальция, повышалась до по меньшей мере 65 мМ. Экспериментальное наблюдение свидетельствует об обратном, где концентрация кальция снижается и становится ниже концентрации в буфере для DF после сверхконцентрирования. Как показано в таблице 1 ниже, применение целевой концентрации Ca, составляющей 20 мМ, приводит к достижению уровня кальция при сверхконцентрировании, составляющего всего 8,2 мМ.

Таблица 1. Краткое описание концентрации кальция на различных стадиях получения.

Целевая концентрация кальция (мМ)	Фактическая концентрация кальция (мМ) (измеренная в буфере для	Фактическая концентрация кальция (мМ) (измеренная в буфере	Фактическая концентрация кальция (мМ) (измеренная в сверхконцентрированном ретентате DF)	Фактическая концентрация кальция (мМ), измеренная при

	DF)	после DF)		имитации DS
10	8,7	6,3	2,6	4,3
15	13,9	11,1	4,6	7,3
20	19,0	14,6	9,2	10,9
23	22,4	16,8	8,9	13,1

Таблица 2. Краткое описание исключения кальция в ходе сверхконцентрирования.

Концентрация антитела (мг/мл)	Фактическая концентрация кальция (мМ)
66,15	14,1
98,66	12,6
118,59	12,1
135,49	11,7
153,24	10,7
173,99	10,2

Хотя влияния исключения объема способны изменять состав буфера в ретентате, также возможно, что ионы кальция преимущественно координируются по отношению к белку или разделяются по причине изменения растворимости вследствие повышения температуры и/или высоких значений локальной концентрации белка в ходе фильтрации.

В данном примере описывается иллюстративный способ очистки антитела, в ходе которого применяют замену буфера при повышенной температуре (например, посредством стадии ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF)) для концентрирования и замены буфера буфером для диафильтрации, содержащим соль кальция, с получением конечной фармацевтической композиции на основе антитела (например, с концентрацией, составляющей приблизительно 120 г/л). Возможность восстанавливать белок с высокой концентрацией из сверхконцентрированного состояния с использованием как высокой температуры (например, 37°C), так и более высоких значений концентрации соли кальция (например, ацетата кальция) является неожиданной, принимая во внимание влияния растворимости ацетата кальция при повышенных значениях температуры.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фармацевтического состава на основе антитела, обладающего вязкостью, составляющей 10 сП или меньше, включающий замену буфера в композиции, содержащей антитело, буфером для диафильтрации, содержащим соль кальция, при температуре выше 30°С.

2. Способ по п. 1, где стадию замены осуществляют посредством ультрафильтрации/диафильтрации.

3. Способ по п. 1, где композиция содержит антитело в концентрации, составляющей по меньшей мере 90 мг/мл.

4. Способ по п. 1, где композиция содержит антитело в концентрации, составляющей по меньшей мере 120 мг/мл.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где стадию замены осуществляют при температуре, составляющей 30-40°С.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где стадию замены осуществляют при температуре выше 35°С.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где стадию замены осуществляют при 37°С.

8. Способ по п. 1, где соль кальция представляет собой ацетат кальция.

9. Способ по п. 1, где буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере 20 мМ ацетата кальция.

10. Способ по п. 9, где буфер для диафильтрации содержит приблизительно 23 мМ ацетата кальция.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где буфер для диафильтрации дополнительно содержит полиол.

12. Способ по п. 11, где полиол представляет собой сахарозу.

13. Способ по п. 12, где буфер для диафильтрации содержит сахарозу, присутствующую в концентрации, составляющей от приблизительно 1% до приблизительно 15%.

14. Способ по п. 12, где буфер для диафильтрации содержит сахарозу в концентрации, составляющей приблизительно 7%.

15. Способ по любому из пп. 1-14, дополнительно включающий стадию фильтрации фармацевтического состава.

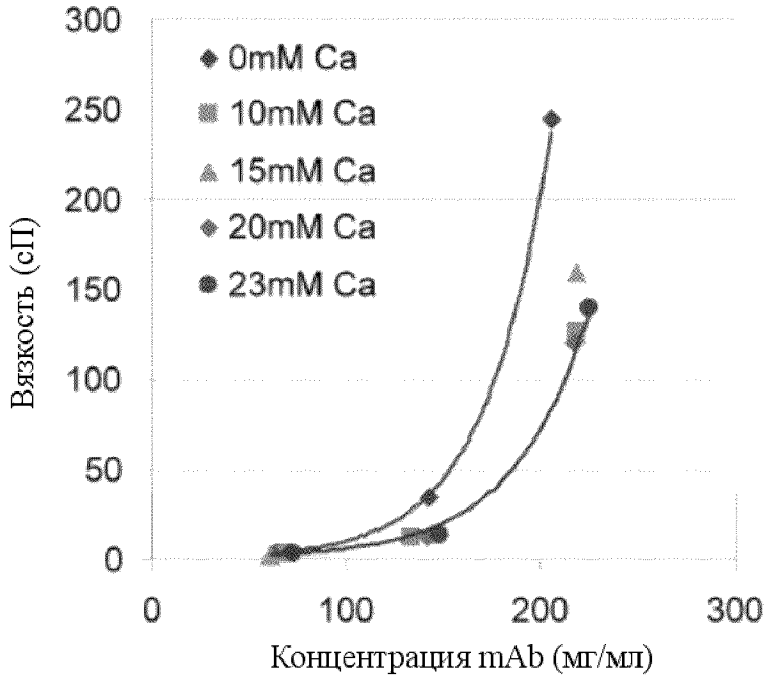
16. Способ по любому из пп. 1-14, дополнительно включающий стадию разделения фармацевтического состава на аликвоты в виде готовой лекарственной формы.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где антитело представляет собой ромосозумаб, абциксимаб, адалимумаб, алемтузумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, брентуксимаб ведотин, канакинумаб, цетуксимаб, цертолизумаба пэгол, даклизумаб, деносумаб, экулизумаб, эфализумаб, гемтузумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, инфликсимаб, ипилимумаб, муромонаб-CD3, натализумаб, ниволумаб, офатумумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, ранибизумаб, ритуксимаб, тоцилизумаб, тоситумомаб, трастузумаб или устекинумаб, ведолизумаб.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где фармацевтический состав после стадии замены содержит приблизительно 50 мМ ацетата и приблизительно 12 мМ кальция.

По доверенности

Фигура 1



Фигура 2

Наклон = -k			C-wall = exp (x-int)	
240 LMH				
фунтов/ кв. дюйм	наклон	k-значение	x-int	C-wall
10	-19,333	19,333	5,189054984	179,299
15	-21,919	21,919	5,21967243	184,8736
20	-21,634	21,634	5,29351946	199,0427
25	-23,502	23,502	5,167645307	175,5011
30	-21,726	21,726	5,264659855	193,3805
			Avg C-wall	186,4194
			Avg k-значение	21,6228

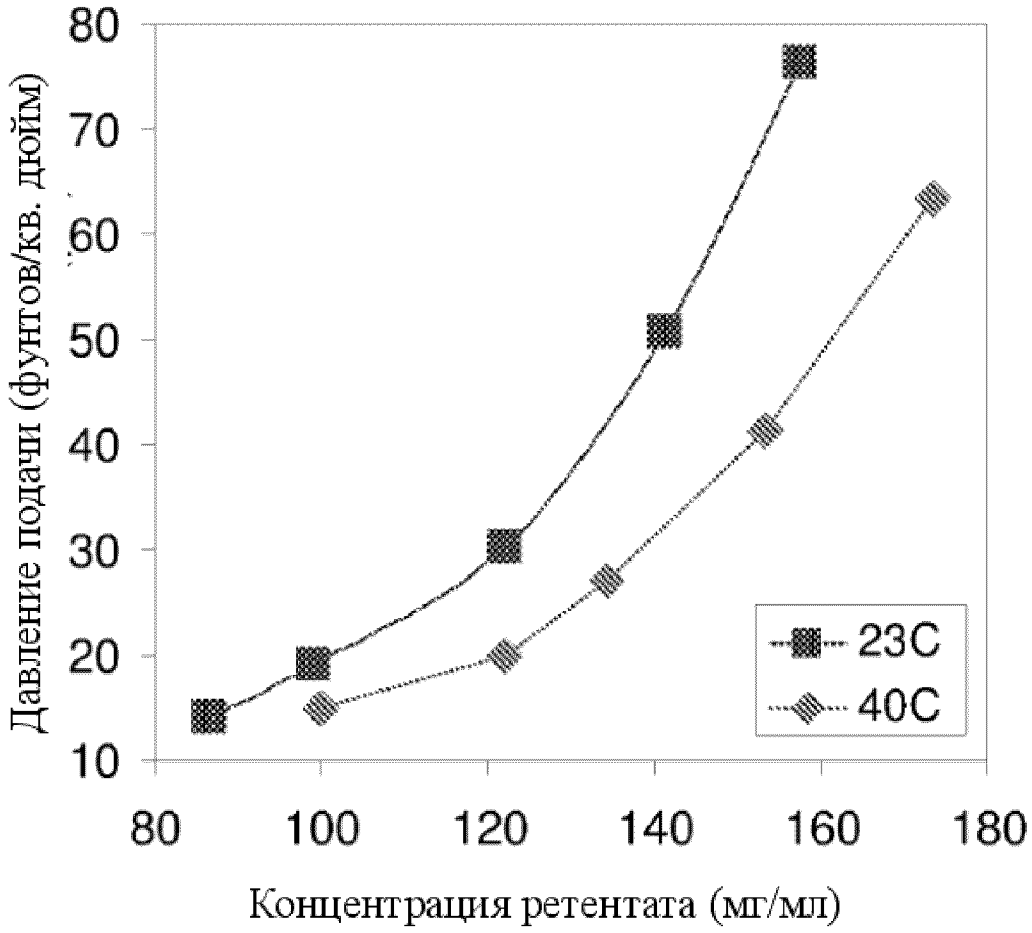
Скорость поперечного потока	240 LMH	300 LMH	360 LMH
	Буфер для диафильтрации без ацетата кальция		
k (LMH)	21,6	26,0	28,7
C_{wall} (г/л)	186,4	174,1	173,0

Фигура 3

Наклон = -k		C-wall = exp (x-int)		
90 LMH				
фунтов/ кв. дюйм	наклон	k-значение	x-int	C-wall
10	-14,08	14,08	5,15	173,06
15	-14,91	14,91	5,29	197,72
20	-12,48	12,48	5,51	247,21
25	-12,50	12,50	5,49	242,89
30	-12,48	12,48	5,47	237,60
			Avg C-wall	219,70
			Avg k-значение	13,29

Скорость поперечного потока	240 LMH	300 LMH	360 LMH
	Буфер для диафильтрации без ацетата кальция		
k (LMH)	13,3	19,7	24,7
C_{wall} (г/л)	219,7	194,3	174,6

Фигура 4


Давление подачи (фунтов/кв. дюйм)
80
70
60
50
40
30
20
10
80
100
120
140
160
180
Концентрация ретентата (мг/мл)
23C
40C