

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393219** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.12

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(51) Int. Cl. *A61K 9/19* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

(54) **УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВЫХ СОСТАВОВ**

(31) **63/195,265**

(32) **2021.06.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/031694**

(87) **WO 2022/256359 2022.12.08**

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Маккормик Джефф, Маколи Арнольд
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе описаны ускоренные способы получения лиофилизированных составов, содержащих белок, такой как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которые демонстрируют повышенную стабильность при хранении.

A1

202393219

202393219

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579496EA/019

УСКОРЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВЫХ СОСТАВОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к ускоренным способам получения лиофилизированных составов, содержащих белок, например, антитело или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которые демонстрируют улучшенную стабильность при хранении.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с данной заявкой и обозначен следующим образом: Имя файла: I-56846_Seqlisting.txt; Размер: 345286 байт; создан 12 мая 2022 г.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Фармацевтические препараты на основе белков, такие как фармацевтические препараты, содержащие антитела, фрагменты антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы, приобретают все большее значение для лечения различных заболеваний и состояний. Тем не менее, белки обладают низкой степенью стабильности и в высокой степени подвержены как химической, так и физической деградации. Химическая деградация относится к модификациям, в которые вовлечены ковалентные связи, таким как дезамидирование, окисление, расщепление, отщепление/фрагментация, образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризация или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхностях и агрегацию. Решение проблем, обусловленных такой физической и химической нестабильностью, является одной из наиболее сложных задач при разработке фармацевтических препаратов на основе белков (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, №. 9, Sept 2003, стр. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

[0004] Антигенсвязывающие молекулы с увеличенным периодом полужизни (например, биспецифические активаторы, рекрутирующие Т-клетки (ViTE®), содержащие форму, удлиняющую период полужизни, такую как Fc-молекулы), в частности, должны быть защищены от агрегации белков и/или других процессов деградации. Агрегация белков в молекулах ViTE® является проблематичной, поскольку это может ухудшить биологическую активность и качество (характеристики) терапевтических белков. Более того, агрегация молекул ViTE® может привести к снижению выхода продукта из-за необходимости проведения сложных стадий очистки для удаления агрегатов из конечного продукта. В последнее время также растет беспокойство и появляются доказательства того, что наличие агрегированных белков (даже гуманизированных или полностью

человеческих белков) может значительно увеличить риск развития у пациента иммунного ответа на активный мономер белка, что приводит к образованию нейтрализующих антител и лекарственной устойчивости или другим неблагоприятным побочным эффектам (Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34).

[0005] Фармацевтические составы на основе белков часто лиофилизируют и хранят в твердом состоянии, что позволяет сохранить целостность белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула, в составе в процессе хранения. Тем не менее, многие существующие способы лиофилизации составов на основе белка не позволяют получить твердофазные составы, которые демонстрируют приемлемую стабильность во времени и, которые производятся быстрее по сравнению с известными способами. Таким образом, существует потребность в новых ускоренных способах получения лиофилизированных составов на основе белков, демонстрирующих улучшенную стабильность при хранении.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0006] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает быстрый способ получения лиофилизированного состава, при этом способ включает: (а) охлаждение камеры лиофилизации, в которой содержится жидкий состав, содержащий белок [сахарид и поверхностно-активное вещество], до температуры в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -50°C с получением замороженного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C в течение периода времени от приблизительно 1,0 часа до приблизительно 3,0 часа; (b) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр с получением первично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр в течение периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов; (c) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C с получением вторично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр в течение периода времени от приблизительно 5 часов до приблизительно 12 часов с получением лиофилизированного состава; где жидкий состав характеризуется рН приблизительно 3-7 и не содержит маннита, и в способе отсутствует стадия отжига.

[0007] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает лиофилизированный состав на основе белка, полученный способом по настоящему изобретению.

[0008] Дополнительные аспекты и преимущества будут очевидны специалистам в данной области техники при ознакомлении со следующим подробным описанием. Несмотря на то, что способы, раскрытые в данном документе, допускают варианты

осуществления в различных формах, приведенное ниже описание включает конкретные варианты осуществления с пониманием того, что настоящее раскрытие является иллюстративным и не предназначено для ограничения настоящего изобретения конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0009] На фиг. 1 показаны полученные высушенные массы после завершения цикла, которые оценивали путем визуального осмотра на предмет наличия признаков макроскопического разрушения и общего качества. Полученные массы ВІТЕ В были признаны приемлемыми и показаны фотографии, сделанные с нескольких ракурсов.

[0010] На фиг. 2 показаны значения относительной площади % для высокомолекулярных (НМW) соединений, нанесенные на график в зависимости от времени. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии нестабильности касательно агрегации в течение всего периода исследования.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0011] В данном документе описаны ускоренные способы получения лиофилизированных составов, содержащих белок, например, антитело или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с увеличенным периодом полужизни), которые демонстрируют улучшенную стабильность. Способы ускоренной лиофилизации по настоящему изобретению преимущественно приводят к снижению физической деградации, например, агрегации, а также к снижению химической деградации, например, к снижению отщепления и дезамидирования. Более того, раскрытые в данном документе способы ускоренной лиофилизации способны стабилизировать составы на основе белков, например, составы, содержащие антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы, как с низкой концентрацией, так и с высокой концентрацией.

Определения

[0012] При использовании в данном документе термин «фармацевтический состав» относится к составу, который является подходящим для введения нуждающемуся в этом субъекту. Термины «субъект», или «индивидуум», или «животное», или «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту, в частности субъекту-млекопитающему, для которого требуется введение фармацевтического состава по настоящему изобретению. Субъекты-млекопитающие включают людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т. п., причем предпочтительными являются люди. Фармацевтический состав по настоящему изобретению является стабильным и фармацевтически приемлемым, т. е. способным вызывать требуемый терапевтический эффект, не вызывая значительных нежелательных местных или системных эффектов у субъекта, которому вводят фармацевтический состав. Фармацевтически приемлемые составы по настоящему изобретению могут быть стерильными. В частности, термин «фармацевтически приемлемый» может означать

одобрение регулирующего органа или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных и более конкретно у людей, но не ограничивается теми, которые утверждены регулирующим органом.

[0013] Термин «стабильность» или «стабилизация» относится к стабильности фармацевтического состава в целом и, в частности, к стабильности самого активного ингредиента (например, белка, такого как биспецифическая антигенсвязывающая молекула), в частности, при составлении, наполнении, транспортировке, хранении и введении. «Стабильный состав» представляет собой состав, в котором содержащийся в нем белок (такой как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула) по существу сохраняет свою физическую и/или химическую целостность и биологическую активность при хранении и во время процессов (таких как замораживание/оттаивание, механическое смешивание и лиофилизация). Стабильность белков может быть определена по образованию высокомолекулярных (HMW) соединений, потере активности ферментов, образованию пептидных фрагментов и смещению профилей заряда.

[0014] При использовании в данном документе термин «агрегация» относится к прямому взаимному притяжению между молекулами, например, с помощью сил Ван-дер-Ваальса или образования химической связи. В частности, под агрегацией понимается накопление и слипание белков друг с другом. Агрегаты могут включать аморфные агрегаты и олигомеры и, как правило, называются высокомолекулярными (HMW) соединениями, т. е. молекулами с более высокой молекулярной массой, чем молекулы продукта, которые представляют собой неагрегированные молекулы.

[0015] При использовании в данном документе термин «(белковый) агрегат» обычно охватывает соединения белка с более высокой молекулярной массой, такие как «олигомеры» или «мультимеры», вместо требуемых определенных соединений (например, мономера). В данном документе этот термин используется взаимозаменяемо с терминами «высокомолекулярные» соединения и «HMW». Белковые агрегаты, как правило, могут отличаться по размеру (в диапазоне от небольших (димеры) до крупных скоплений (невидимые или даже видимые частицы) и от нанометрового до микрометрового диапазона в диаметре), по морфологии (от примерно сферической до фибриллярной), по структуре белка (нативная или ненативная/денатурированная), по типу межмолекулярной связи (ковалентная или нековалентная), по обратимости и растворимости. Растворимые агрегаты охватывают диапазон размеров примерно от 1 до 100 нм, а белковые частицы охватывают невидимый (~0,1-100 нм) и видимый (>100 нм) диапазоны. Все вышеперечисленные типы белковых агрегатов, как правило, охватываются термином. Таким образом, термин «(белковый) агрегат» относится ко всем видам физически ассоциированных или химически связанных ненативных соединений двух или больше белковых мономеров.

[0016] При использовании в данном документе термин «низкомолекулярные (LMW) соединения» относится к фрагментам белка, таким как биспецифическая антигенсвязывающая молекула.

[0017] При использовании в данном документе термин «ускоренный способ лиофилизации» относится к способам лиофилизации, которые по меньшей мере на 25% быстрее известных способов, с применением различных температур и значений давления в устройствах для лиофилизации при сохранении стабильности лиофилизированных составов на основе белка, как описано в данном документе.

Способы

[0018] В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен ускоренный способ получения лиофилизированного состава, где в способе отсутствует стадия отжига. Способ включает: (а) охлаждение камеры лиофилизации, в которой содержится жидкий состав, характеризующийся рН приблизительно 3-7, и содержащий белок, сахарид и поверхностно-активное вещество, и не содержащий маннита, до температуры в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C с получением замороженного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C в течение периода времени от приблизительно 1 до приблизительно 3 часов; (b) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно -30°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр с получением первично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр в течение периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов и (c) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 35°C с получением вторично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр в течение периода времени от приблизительно 5 часов до приблизительно 10 часов с получением лиофилизированного состава.

[0019] При использовании в данном документе термин «температура» относится к температуре, которая является внутренней для камеры лиофилизации (внутренняя температура камеры лиофилизации, «внутренняя температура»), при этом именно контролируемую «температуру» лиофилизатора в течение цикла измеряют с помощью температуры на входе силиконового масла, прокачиваемого через полки камеры. Другими словами, это температура жидкости, закачиваемой в металлическую полку камеры, которая приводится в контакт с дном пробирок с образцами). Аналогичным образом, при использовании в данном документе термин «давление» относится к давлению, которое является внутренним для камеры лиофилизации (т. е. внутреннее давление камеры лиофилизации, «внутреннее давление»).

[0020] *Стадия (a)*. На стадии (a) камеру лиофилизации, в которой содержится жидкий состав, охлаждают до температуры (например, внутренней температуры) в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -50°C с получением замороженного состава и выдерживают при температуре (например, внутренней

температуре) в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C в течение периода времени от приблизительно 2 часов до приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления охлаждение осуществляют до температуры в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C (например, приблизительно при -40°C , -41°C , -42°C , -43°C , -44°C , -45°C , -46°C , -47°C , -48°C , -49°C или -50°C). В различных случаях охлаждение может быть осуществлено до температуры приблизительно -45°C . В некоторых случаях охлаждение камеры осуществляют со скоростью в диапазоне от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В различных вариантах осуществления охлаждения осуществляют со скоростью от приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $0,8^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В некоторых вариантах осуществления охлаждения осуществляют со скоростью приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,6^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,7^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,8^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,9^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ или $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В некоторых случаях охлаждение осуществляют со скоростью приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В некоторых вариантах осуществления выдерживание камеры может быть осуществлено при температуре приблизительно -40°C , -41°C , -42°C , -43°C , -44°C , -45°C , -46°C , -47°C , -48°C , -49°C или -50°C . В некоторых вариантах осуществления выдерживание осуществляют при температуре приблизительно -45°C . В некоторых вариантах осуществления температура, до которой охлаждают камеру лиофилизации, и температура выдерживания являются одинаковыми. В различных вариантах осуществления выдерживание осуществляют в течение периода времени от приблизительно 1 часа до приблизительно 3 часов (например, приблизительно 1 час, 1,5 часа, 2 часа, 2,5 часа или 3 часа). В некоторых случаях выдерживание осуществляют в течение приблизительно 2 часов.

[0021] Стадия (b). На стадии (b) камеру лиофилизации нагревают до температуры (например, внутренней температуры) в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -20°C и при давлении (например, внутреннем давлении) в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр с получением первично высушенного состава и выдерживают при температуре (например, внутренней температуре) в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -20°C и при давлении (например, внутреннем давлении) в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр в течение периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов. В некоторых вариантах осуществления нагревание осуществляют до температуры приблизительно -35°C , -34°C , -33°C , -32°C , -31°C , -30°C , -29°C , -28°C , -27°C , -26°C , -25°C , -24°C , -23°C , -22°C , -21°C или -20°C . В различных случаях нагревание осуществляют до температуры приблизительно -27°C . В некоторых случаях нагревание осуществляют со скоростью в диапазоне от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В различных вариантах осуществления нагревание осуществляют со скоростью от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ (например, $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,2^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, $0,4^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ или $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$). В некоторых случаях нагревание осуществляют со скоростью приблизительно $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ В различных случаях нагревание осуществляют при давлении в диапазоне от

приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр, или от приблизительно 80 мторр до приблизительно 120 мторр, или от приблизительно 85 мторр до приблизительно 115 мторр, или от приблизительно 90 мторр до приблизительно 110 мторр. В некоторых случаях нагревание осуществляют при давлении приблизительно 95 мторр, 96 мторр, 97 мторр, 98 мторр, 99 мторр, 100 мторр, 101 мторр, 102 мторр, 103 мторр, 104 мторр или 105 мторр. В различных вариантах осуществления нагревание осуществляют при давлении приблизительно 100 мторр. В некоторых вариантах осуществления выдерживание камеры осуществляют при температуре приблизительно -35°C , -34°C , -33°C , -32°C , -31°C , -30°C , -29°C , -28°C , -27°C , -26°C , -25°C , -24°C , -23°C , -22°C , -21°C или -20°C . В различных случаях выдерживание осуществляют при температуре приблизительно -27°C . В различных вариантах осуществления выдерживание осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр, или от приблизительно 80 мторр до приблизительно 120 мторр, или от приблизительно 85 мторр до приблизительно 115 мторр, или от приблизительно 90 мторр до приблизительно 110 мторр. В некоторых случаях нагревание осуществляют при давлении приблизительно 95 мторр, 96 мторр, 97 мторр, 98 мторр, 99 мторр, 100 мторр, 101 мторр, 102 мторр, 103 мторр, 104 мторр или 105 мторр. В различных вариантах осуществления нагревание осуществляют при давлении приблизительно 100 мторр. В некоторых вариантах осуществления температура, до которой нагревают камеру лиофилизации, и температура выдерживания являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления давление, под которым нагревают камеру лиофилизации, и давление выдерживания являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления температура, до которой нагревают камеру лиофилизации, и температура выдерживания являются одинаковыми, а давление, под которым нагревают камеру лиофилизации, и давление выдерживания являются одинаковыми. В некоторых случаях выдерживание осуществляют в течение периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов (например, приблизительно 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов, 17 часов или 18 часов). В различных случаях выдерживание осуществляют в течение периода времени от приблизительно 16 до 17 часов, например, в течение 16,7 часа.

[0022] *Стадия (с)*. На стадии (с) камеру нагревают до температуры (например, внутренней температуры) в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 35°C с получением вторично высушенного состава и выдерживают при температуре (например, внутренней температуре) в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 35°C и при давлении (например, внутреннем давлении) в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр в течение периода времени от приблизительно 5 часов до приблизительно 12 часов с получением лиофилизированного состава. В некоторых вариантах осуществления нагревание осуществляют до температуры приблизительно 20°C , 21°C , 22°C , 23°C , 24°C , 25°C , 26°C , 27°C , 28°C , 29°C , 30°C , 31°C , 32°C , 33°C , 34°C или 35°C . В различных случаях нагревание осуществляют до температуры приблизительно 25°C . В различных вариантах осуществления нагревание осуществляют

со скоростью в диапазоне приблизительно 0,3-0,5°C/мин. с получением вторично высушенного состава. В некоторых случаях нагревание осуществляют со скоростью от приблизительно 0,05°C/мин. до приблизительно 0,5°C/мин. В различных случаях нагревание осуществляют со скоростью приблизительно 0,05°C/мин., 0,1°C/мин., 0,15°C/мин., 0,2°C/мин., 0,25°C/мин., 0,3°C/мин., 0,35°C/мин., 0,4°C/мин., 0,45°C/мин. или 0,5°C/мин. В некоторых вариантах осуществления нагревание осуществляют со скоростью приблизительно 0,4°C/мин. В некоторых вариантах осуществления выдерживание осуществляют при температуре приблизительно 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C или 30°C. В различных случаях выдерживание осуществляют при температуре приблизительно 25°C. В некоторых вариантах осуществления температура, до которой нагревают камеру лиофилизации, является такой же, как и температура выдерживания. В некоторых вариантах осуществления выдерживание осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр, или от приблизительно 70 мторр до приблизительно 100 мторр, или от приблизительно 65 мторр до приблизительно 75 мторр. В некоторых случаях выдерживание осуществляют при давлении приблизительно 65 мторр, 66 мторр, 67 мторр, 68 мторр, 69 мторр, 70 мторр, 71 мторр, 72 мторр, 73 мторр, 74 мторр или 75 мторр. В различных вариантах осуществления выдерживание осуществляют при давлении приблизительно 70 мторр. В некоторых случаях выдерживание осуществляют в течение периода времени приблизительно 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов или 10 часов. В различных случаях выдерживание осуществляют в течение периода времени приблизительно 8,1 часа, 8,2 часа, 8,3 часа, 8,4 часа, 8,5 часа. В одном случае выдерживание осуществляют в течение периода времени приблизительно 8,3 часа.

[0023] В вариантах осуществления любой из описанных в данном документе способов (со стадией отжига или без нее) может дополнительно включать (d) охлаждение камеры, в которой содержится лиофилизированный состав со стадии (c), до температуры в диапазоне от приблизительно 1°C до приблизительно 10°C (или от приблизительно 2°C до приблизительно 7°C, или до приблизительно 5°C) и аэрирование лиофилизированного состава инертным газом при давлении в диапазоне от приблизительно 250 мторр до приблизительно 750 мторр (или от приблизительно 300 мторр до приблизительно 600 мторр, или до приблизительно 500 мторр). В некоторых случаях инертный газ выбран из аргона, гелия, азота и любой их комбинации. В различных случаях инертный газ представляет собой азот. В вариантах осуществления стадия (d) может способствовать закупориванию контейнера (например, флакона), содержащего лиофилизированный состав. В вариантах осуществления способ дополнительно включает хранение лиофилизированного состава при температуре в диапазоне от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C. В вариантах осуществления способ дополнительно включает восстановление лиофилизированного состава с помощью воды.

[0024] В еще одном другом аспекте настоящее изобретение предусматривает лиофилизированный состав на основе белка, полученный способом по настоящему

изобретению. В некоторых вариантах осуществления состав на основе белка получают способом, раскрытым в данном документе, в котором отсутствует стадия отжига.

Лиофилизированный состав на основе белка

[0025] Лиофилизированные составы на основе белков, описанные в данном документе, включают белок, сахарид, поверхностно-активное вещество и необязательно буфер и характеризуются рН от приблизительно 3 до приблизительно 7 (или приблизительно 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5 или 7). В некоторых случаях рН составляет от приблизительно 4 до приблизительно 6. В некоторых случаях рН состава составляет приблизительно 4 или приблизительно 4,2. В различных случаях рН состава составляет приблизительно 5. В некоторых вариантах осуществления рН состава составляет приблизительно 6. В вариантах осуществления лиофилизированный состав, раскрытый в данном документе, не содержит сахарного спирта. При использовании в данном документе «сахарный спирт» относится к линейному полиолу, в котором одна гидроксильная группа присоединена к каждому атому углерода. При использовании в данном документе примеры сахарных спиртов включают ксилит, эритритол, маннит и сорбитол. В вариантах осуществления лиофилизированный состав не содержит маннита.

[0026] *Белок*

[0027] В некоторых вариантах осуществления белок из лиофилизированного состава представляет собой антигенсвязывающий белок. «Антигенсвязывающий белок» представляет собой белок, содержащий домен, связывающий указанный целевой антиген (такой как CD3 и/или CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2 или MUC17). Антигенсвязывающий белок содержит остов или каркасную часть, которые позволяют антигенсвязывающему домену принимать конформацию, способствующую связыванию антигенсвязывающего белка с антигеном.

[0028] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок из лиофилизированного состава представляет собой антитело, или иммуноглобулин, или антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок представляет собой антитело. Термин «антитело» относится к интактному антигенсвязывающему иммуноглобулину. «Антитело» представляет собой тип антигенсвязывающего белка. Антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В различных вариантах осуществления интактное антитело содержит две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитело содержит переменную область и константную область. В форматах IgG переменная 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. Переменная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service NIH, Bethesda, MD; 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 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше). Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы.

[0029] В некоторых вариантах осуществления антитело из состава представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, т. е. антигенсвязывающую молекулу, которая связывает две различные мишени (например, CD3 и вторую, другую мишень). При использовании в данном документе термин «биспецифический» относится к антигенсвязывающей молекуле или конструкции, которая связывается с двумя разными антигенами-мишенями, т. е., она содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (например, поверхностным антигеном клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (например, CD3). Соответственно, антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению обладают специфичностями в отношении двух различных антигенов или мишеней. Термин «поверхностный антиген клетки-мишени» относится к антигенной структуре, которая экспрессируется клеткой и которая присутствует на клеточной поверхности, так что она является доступной для антигенсвязывающей молекулы или антигенсвязывающей конструкции, описанной в данном документе. Поверхностный антиген клетки-мишени может представлять собой белок, например, внеклеточную часть белка, или углеводную структуру, например, углеводную структуру белка, например, гликопротеин. Поверхностный антиген клетки-мишени может представлять собой опухолевый антиген. Настоящее изобретение также охватывает мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или конструкции, такие как триспецифические антигенсвязывающие молекулы или конструкции, последние из которых включают три связывающих домена или конструкции с более чем тремя (например, четырьмя, пятью...) типами специфичности.

[0030] Биспецифические антитела и/или антигенсвязывающие молекулы или конструкции, как понятно из данного описания, включают без ограничения традиционные биспецифические иммуноглобулины (например, BsIgG), IgG, содержащий присоединенный антигенсвязывающий домен (например, амино- или карбокси-концы легкой или тяжелой цепей соединены с дополнительными антигенсвязывающими доменами, такими как однодоменные антитела или спаренные переменные домены антител (например, Fv или scFv)), фрагменты BsAb (например, биспецифические одноцепочечные антитела), биспецифические слитые белки (например, антигенсвязывающие домены, слитые с эффекторным фрагментом) и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015), в которой описаны различные биспецифические форматы и которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры биспецифических конструкций включают без ограничения диатела, одноцепочечные диатела, тандемные scFv, биспецифические форматы активаторов, рекрутирующих Т-клетки (BiTE®) (слитый белок, состоящий из двух

одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), соединенных линкером) и биспецифические Fab2, а также разработанные конструкции, содержащие полноразмерные антитела. См, например, Chames & Baty, 2009, mAbs 1[6]:1-9; и Holliger & Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23[9]:1126-1136; Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297; Michaelson et al., 2009, mAbs 1[2]:128-141; публикации международных заявок № 2009032782 и 2006020258; Zuo et al., 2000, Protein Engineering 13[5]:361-367; публикацию заявки на патент США № 20020103345; Shen et al., 2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672; и Kontermann, 2012 MAbs 4(2):182, все из которых в явной форме включены в данный документ.

[0031] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные составы, описанные в данном документе, содержат биспецифическую антигенсвязывающую молекулу или конструкцию, содержащую первый связывающий домен, который связывается с целевым антигеном клеточной поверхности, второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, и необязательно третий домен, содержащий, в направлении от аминоконца к карбоксильному концу, шарнирная область-домен CH2-домен CH3-линкер-шарнирная область-домен CH2-домен CH3. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL.

[0032] При использовании в данном документе термин «связывающий домен» относится к домену, который (специфично) связывается с/взаимодействует с/распознает указанный эпитоп-мишень или указанный сайт-мишень на молекулах-мишенях (антигенах), например CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN6, CLDN18.2 или MUC17 и CD3 соответственно.

[0033] Структура и функция первого связывающего домена (распознающего, например, CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN6, CLDN18.2 или MUC17) и также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего CD3) основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина, и/или он/они получен/получены из доменов вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и/или вариабельного участка легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. В вариантах осуществления первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). В вариантах осуществления второй связывающий домен также предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. В вариантах осуществления второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или три CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Предусматривается, что первый и/или второй связывающий домен получают или могут быть получены посредством способов фагового дисплея или скрининга библиотек, а не посредством прививания последовательностей CDR из уже существующего

(моноклонального) антитела на каркас.

[0034] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и/или второй связывающий домен, который связывается с CD3ε, является/являются связывающим(и) доменом(-ами) человека. Антитела и антигенсвязывающие молекулы или конструкции на основе антител, содержащие по меньшей мере один человеческий связывающий домен, позволяют избежать ряда проблем, ассоциированных с антителами или конструкциями на основе антител, которые имеют переменные и/или константные области, не относящиеся к человеческим, такие как области от грызунов (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Присутствие таких белков, полученных из организма грызуна, может приводить к быстрому выведению антител, или антигенсвязывающих молекул, или конструкций, или может приводить к выработке иммунного ответа на антитело, или антигенсвязывающую молекулу, или конструкцию у пациента. Чтобы избежать применения, полученных из организма грызуна, антител, или антигенсвязывающих молекул, или конструкций, могут быть созданы человеческие или полностью человеческие антитела/антигенсвязывающие молекулы путем введения в грызуна функциональных участков человеческого антитела так, чтобы у грызуна продуцировались полностью человеческие антитела.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок предусматривает одноцепочечную антигенсвязывающую молекулу. scFv содержит переменную область тяжелой цепи, линкер scFv и переменную область легкой цепи. Необязательно С-конец переменной области легкой цепи присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области тяжелой цепи (N-vh-линкер-vl-C), хотя эта конфигурация может быть переставлена (N-vl-линкер-vh-C). Альтернативно С-конец переменной области тяжелой цепи присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области легкой цепи (N-vl-линкер-vh-C), хотя конфигурация может быть переставлена (N-vh-линкер-v-C). Таким образом, конкретно в изображение и описание scFvs включены scFvs в любой ориентации.

[0036] По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены (VH/VL) антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин «пептидный линкер» в соответствии с настоящим изобретением включает аминокислотную последовательность, с помощью которой аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению соединены друг с другом. Пептидные линкеры также могут применяться для слияния третьего домена с другими доменами антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Признаком такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует какая-либо полимеризационная активность. Среди подходящих пептидных линкеров

описаны те, которые приведены в патентах США № 4751180 и № 4935233 или WO 88/09344, раскрытие которых включено в данный документ путем ссылки во всей своей полноте. Пептидные линкеры также могут применяться для присоединения других доменов, или модулей, или областей (таких как домены, продлевающие время полужизни) к биспецифической антигенсвязывающей молекуле, описанной в данном документе.

[0037] В некоторых вариантах осуществления третий домен содержит «Fc», или «область Fc», или «домен Fc», который относится к полипептиду, содержащему константную область антитела, за исключением первого домена иммуноглобулина с константной областью. Таким образом, «домен Fc» относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM и гибкой шарнирной области, расположенной со стороны N-конца по отношению к этим доменам. В случае IgA и IgM, Fc может включать J-цепь. В случае IgG, домен Fc содержит домены иммуноглобулинов C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю шарнирную область между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело IgG (которое включает несколько подклассов, в том числе без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Хотя границы области Fc могут изменяться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется по включению остатков C226 или P230 в ее карбоксильный конец, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых вариантах осуществления в область Fc вносят аминокислотные модификации, например, для изменения связывания с одним или несколькими рецепторами Fc γ R или с рецептором FcRn.

[0038] В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, содержат биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывает CD3 человека и CDH19 человека, или CD3 человека и MSLN человека, или CD3 человека и DLL3 человека, или CD3 человека и FLT3 человека, или CD3 человека и EGFRvIII человека, или CD3 человека и BCMA человека, или CD3 человека и PSMA человека, или CD3 человека и CD33 человека, или CD3 человека и CD19 человека, CD3 человека и CD70 человека, или CD3 человека и MUC17 человека, или CD3 человека и CLDN18.2 человека, или CD3 человека и CLDN6 человека.

[0039] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит набор из 6 CDR, представленный под (a) SEQ ID NO: 24-29, (b) SEQ ID NO: 34-39, (c) SEQ ID NO: 78-83, (d) SEQ ID NO: 10-15, (e) SEQ ID NO: 46-51, (f) SEQ ID NO: 88-93, (g) SEQ ID NO: 67-72, (h) SEQ ID NO: 56-61, (i) SEQ ID NO: 112-117, (j) SEQ ID NO: 100-105, (k) SEQ ID NO: 148-153, SEQ ID NO: 157-162, или SEQ ID NO: 166-171, или SEQ ID NO: 175-180, (l) SEQ ID NO: 132-137 или (m) SEQ ID NO: 123-128.

[0040] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%

идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129.

[0041] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, где первый связывающий домен содержит: (a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 30, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 31; (b) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 41; (c) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 84, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 85; (d) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16 или 17, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18 или 19; (e) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 52, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 53; (f) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 94, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 95; (g) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 74; (h) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 63; (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 118, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную

под SEQ ID NO: 119; (j) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182; (k) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 106, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 107; (l) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 138 или 143, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 139 или 144; или (m) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 129, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 130.

[0043] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит набор из 6 CDR, представленный под SEQ ID NO: 1-6.

[0044] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7.

[0045] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен биспецифической антигенсвязывающей молекулы содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[0046] В некоторых вариантах осуществления, где второй связывающий домен содержит (a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[0047] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает CD19, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к

цепи антитела к FLT3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 65 или 66.

[0051] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает EGFRvIII, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к EGFRvIII, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к EGFRvIII, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 33.

[0052] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает BCMA, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к BCMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к BCMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 97.

[0053] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая

антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает PSMA, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или 107, и переменный домен тяжелой цепи антитела к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или 106, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 или 108, второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 121, 122, 109, 110 или 111.

[0054] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает CD33, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 19, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189 или 190, второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

[0055] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает CDH19, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, второй связывающий домен,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55.

[0056] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает MUC17, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 156, 165, 174 или 183.

[0057] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает cldn18.2, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или 144, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или 143, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или 145, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 141, 142, 146 или 147.

[0058] В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первый связывающий домен, который связывает CD70, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит аминокислотную

последовательность, представленную под SEQ ID NO: 131.

[0059] В некоторых вариантах осуществления белок из состава представляет собой антитело. В различных вариантах осуществления белок из состава представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. В некоторых случаях белок из состава представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с увеличенным периодом полужизни. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы с увеличенным периодом полужизни были ранее описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления состав на основе белка по настоящему изобретению предусматривает аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1-190. В различных вариантах осуществления состав на основе белка по настоящему изобретению предусматривает аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188. В некоторых случаях состав на основе белка по настоящему изобретению предусматривает аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22 (BiTE A), SEQ ID NO: 77 (BiTE B), SEQ ID NO: 87 (BiTE C) или SEQ ID NO: 97 (BiTE D).

[0060] В некоторых вариантах осуществления белок, такой как антитело или биспецифический белок (например, конструкции на основе биспецифического антитела с HLE), присутствует в жидком составе (до лиофилизации) в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл (или приблизительно 0,1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, 30 мг/мл, 35 мг/мл, 40 мг/мл, 45 мг/мл, 50 мг/мл, 55 мг/мл, 60 мг/мл, 65 мг/мл, 70 мг/мл, 75 мг/мл, 80 мг/мл, 85 мг/мл, 90 мг/мл, 95 мг/мл или 100 мг/мл). В различных вариантах осуществления белок присутствует в жидком составе в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл. В некоторых случаях белок присутствует в жидком составе в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл (или приблизительно 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл, 0,7 мг/мл, 0,8 мг/мл, 0,9 мг/мл, 1 мг/мл, 2 мг/мл, 3 мг/мл, 4 мг/мл, 5 мг/мл, 6 мг/мл, 7 мг/мл, 8 мг/мл, 9 мг/мл, 10 мг/мл, 11 мг/мл, 12 мг/мл, 13 мг/мл, 14 мг/мл, 15 мг/мл, 16 мг/мл, 17 мг/мл, 18 мг/мл, 19 мг/мл, 20 мг/мл, 21 мг/мл, 22 мг/мл, 23 мг/мл, 24 мг/мл, 25 мг/мл, 26 мг/мл, 27 мг/мл, 28 мг/мл, 29 мг/мл или 30 мг/мл). В различных случаях белок присутствует в жидком составе в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл (или приблизительно 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл, 2,5 мг/мл, 3 мг/мл, 3,5 мг/мл, 4 мг/мл, 4,5 мг/мл, 5 мг/мл, 5,5 мг/мл, 6 мг/мл, 6,5 мг/мл, 7 мг/мл, 7,5 мг/мл, 8 мг/мл, 8,5 мг/мл, 9 мг/мл, 9,5 мг/мл, 10 мг/мл, 10,5

мг/мл, 11 мг/мл, 11,5 мг/мл, 12 мг/мл, 12,5 мг/мл, 13 мг/мл, 13,5 мг/мл, 14 мг/мл, 14,5 мг/мл, 15 мг/мл, 15,5 мг/мл, 16 мг/мл, 16,5 мг/мл, 17 мг/мл, 17,5 мг/мл, 18 мг/мл, 18,5 мг/мл, 19 мг/мл, 19,5 мг/мл или 20 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления белок присутствует в жидком составе в количестве приблизительно 1 мг/мл.

[0061] *Сахарид*

[0062] Состав на основе белка по настоящему изобретению содержит сахарид. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид. Подходящие сахариды включают, например, глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу или любую их комбинацию. В некоторых случаях сахарид предусматривает сахарозу.

[0063] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав (до лиофилизации) содержит сахарид в концентрации от приблизительно 1% до приблизительно 15% вес/объем, или от приблизительно 4% до приблизительно 13% вес/объем, или от приблизительно 6% до приблизительно 12% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит сахарид в концентрации 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% или по меньшей мере 14% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит сахарид в концентрации 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% или приблизительно 15% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит сахарид в концентрации приблизительно 7%, приблизительно 7,5%, приблизительно 8%, приблизительно 8,5%, приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, приблизительно 10%, приблизительно 10,5%, приблизительно 11%, приблизительно 11,5% или приблизительно 12% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит сахарид в концентрации от приблизительно 7% до приблизительно 12% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит сахарид в концентрации приблизительно 9% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления сахарид представляет собой сахарозу и присутствует в жидком составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 6% до приблизительно 12% вес/объем. В некоторых случаях сахарид представляет собой сахарозу и присутствует в жидком составе в концентрации приблизительно 9% вес/объем.

[0064] *Поверхностно-активное вещество*

[0065] Состав на основе белка по настоящему изобретению содержит поверхностно-активное вещество. Подходящие поверхностно-активные вещества включают полисорбат, полочсамер, полиоксиэтилен или любую их комбинацию. Рассматриваемые поверхностно-активные вещества включают полисорбат 20, полисорбат

40, полисорбат 60, полисорбат 80, полоксамер 188, полоксамер 407, тритон X-100, полиоксиэтилен, PEG 3350, PEG 4000 и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество предусматривает полисорбат. В некоторых случаях поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

[0066] Составы на основе белков, описанные в данном документе, могут содержать одно поверхностно-активное вещество или смесь поверхностно-активных веществ. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав (до лиофилизации) содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 5% вес/объем (или от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5% вес/объем, или от приблизительно 0,004 до приблизительно 0,5% вес/объем, или от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% вес/объем, или от приблизительно 0,004 до приблизительно 0,01% вес/объем). В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации по меньшей мере 0,001, по меньшей мере 0,002, по меньшей мере 0,003, по меньшей мере 0,004, по меньшей мере 0,005, по меньшей мере 0,007, по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,05, по меньшей мере 0,1, по меньшей мере 0,2, по меньшей мере 0,3, по меньшей мере 0,4, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,6, по меньшей мере 0,7, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 2,5, по меньшей мере 3,0, по меньшей мере 3,5, по меньшей мере 4,0 или по меньшей мере 4,5% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001%, приблизительно 0,002%, приблизительно 0,003%, приблизительно 0,004%, приблизительно 0,005%, приблизительно 0,006%, приблизительно 0,007%, приблизительно 0,008%, приблизительно 0,009%, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,05%, приблизительно 0,1%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,4% до приблизительно 0,5% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления жидкий состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,01% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80, и при этом полисорбат-80 присутствует в концентрации приблизительно 0,01% вес/объем.

[0067] *Буфер*

[0068] Состав на основе белка по настоящему изобретению необязательно содержит буфер. Подходящие буферы включают ацетатные буферы, глутаматные буферы, цитратные буферы, лактатные буферы, сукцинатные буферы, тартратные буферы,

фумаратные буферы, малеатные буферы, гистидиновые буферы, фосфатные буферы, 2-(N-морфолино)этансульфонатные буферы или любую их комбинацию. В некоторых случаях буфер содержит глутаминовую кислоту.

[0069] Буферные средства часто используют для контроля рН в составе. В некоторых вариантах осуществления буфер добавляют в концентрации, которая поддерживает рН жидкого состава от приблизительно 3 до приблизительно 7, или от приблизительно 4 до приблизительно 6, приблизительно 4-5 или приблизительно 4,2. Эффект рН в отношении составов может быть охарактеризован с использованием любого одного или нескольких из некоторого количества подходов, таких как ускоренные исследования стабильности и калориметрические скрининговые исследования (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)).

[0070] Буферную систему, присутствующую в составе на основе белка, выбирают для обеспечения физиологической совместимости и для поддержания требуемого рН. Буфер может присутствовать в жидком составе (до лиофилизации) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1000 мМ (1 М), или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ, или от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ. Подходящие концентрации буфера охватывают концентрации приблизительно 200 мМ или меньше. В некоторых вариантах осуществления буфер в жидком составе на основе белка (до лиофилизации) присутствует в концентрации приблизительно 190 мМ, приблизительно 180 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 160 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 140 мМ, приблизительно 130 мМ, приблизительно 120 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 10 мМ или приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах концентрация буфера составляет по меньшей мере 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 или 900 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 мМ до 100 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет от 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 или 40 мМ до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация буфера составляет приблизительно 10 мМ.

[0071] В некоторых вариантах осуществления жидкий состав на основе белка (до лиофилизации) характеризуется рН приблизительно 4,2 и содержит приблизительно 10 мМ L-глутаминовой кислоты, приблизительно 9,0% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,01% (вес/объем) полисорбата 80.

Стабильность лиофилизованного состава на основе белка

[0072] Способы, раскрытые в данном документе, преимущественно приводят к получению лиофилизованного состава на основе белка, который демонстрирует

снижение физической деградации, например, агрегации, а также снижение химической деградации, например, снижение отщепления и дезамидирования, белка при восстановлении с помощью жидкости. Жидкость, используемая для восстановления лиофилизированного состава на основе белка, может представлять собой любую подходящую жидкость, известную в данной области техники. В вариантах осуществления лиофилизированный состав на основе белка может быть восстановлен с помощью воды. Более того, раскрытые в данном документе способы лиофилизации способны стабилизировать составы на основе белков, например, составы, содержащие антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, конструкции на основе биспецифических антител с увеличенным периодом полужизни) как с низкой концентрацией, так и с высокой концентрацией.

[0073] Стабильность состава на основе белка, такого как состав, содержащий антитело или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу (например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), может быть оценена несколькими путями. В некоторых вариантах осуществления стабильность состава на основе белка характеризуется с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC), эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (CE-HPLC), динамического рассеяния света (DLS), аналитического ультрацентрифугирования (AUC), проточного фракционирования в поле (FFF), изоэлектрического фокусирования и ионообменной хроматографии (IEX). В некоторых вариантах осуществления стабильность состава на основе белка, такого как состав на основе антитела, характеризуется частичной диссоциацией, измеряемой с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия (CE-SDS) и/или гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). В некоторых вариантах осуществления стабильность состава оценивают с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS). Способ на основе rCE-SDS позволяет разделять тяжелую цепь (HC), легкую цепь (LC), негликозилированную HC (NGHC) и другие соединения минорных пиков и групп пиков в восстанавливающих условиях.

[0074] В некоторых вариантах осуществления стабильность состава характеризуется количеством высокомолекулярных (HMW) соединений белка, таких как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), или скоростью увеличения количества HMW соединений белка после условий хранения в различные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления количество HMW соединений белка определяется через одну неделю, две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев или двенадцать месяцев хранения при примерно 4°C или 40°C после восстановления. В некоторых вариантах осуществления скорость увеличения HMW соединений белка определяется через одну неделю, две недели, один месяц, три месяца, шесть месяцев или

двенадцать месяцев хранения при примерно 4°C или 40°C после восстановления. В некоторых вариантах осуществления НМВ соединения белка, такие как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE) в восстановленном лиофилизированном составе измеряют с помощью SE-UHPLC.

[0075] Стабильность белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), и способность состава поддерживать стабильность белка может оцениваться в течение длительных периодов времени (например, недель или месяцев). В контексте состава стабильный состав представляет собой такой состав, в котором белок, такой как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (например, биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), по существу, сохраняет свою физическую и/или химическую целостность и/или биологическую активность при хранении и в ходе таких процессов, как замораживание/оттаивание, механическое смешивание и лиофилизация. Стабильность белков может быть оценена, например, путем измерения уровня и/или скорости образования высокомолекулярных (НМВ) агрегатов, сдвига профилей заряда и изменения размера частиц.

[0076] В некоторых вариантах осуществления относительные значения любого конкретного соединения белка, такого как интактная молекула ViTE® или основное соединение, или высокомолекулярное (НМВ) соединение (т. е. агрегаты), или низкомолекулярное (LMW) соединение (т. е. фрагменты), выражены по отношению к соответствующим значениям общего продукта. Например, в некоторых вариантах осуществления 2,5% или меньше (например, 2,5%, или 2%, или 1,9%, или 1,8%, или 1,7%, или 1,6%, или 1,5%, или 1,4%, или 1,3%, или 1,2%, или 1,1%, или 1%, или 0,5%) белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула, существует в виде в НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе. В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 1% (например, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%) при хранении при 4°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев или шести месяцев). В некоторых вариантах осуществления при хранении при 4°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев или шести месяцев) количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,4% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3% или 0,4%). В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 1% (например, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%) при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 0,5%

(например, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%) при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 0,5% (например, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%) при хранении при 40°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, девяти месяцев или двенадцати месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 0,5% при хранении при 40°C в течение одного месяца. В некоторых вариантах осуществления количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 0,3% при хранении при 40°C в течение одного месяца. В некоторых вариантах осуществления при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев) количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,7% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% или 0,7%). В некоторых вариантах осуществления при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев) количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,5% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% и 0,5%). В некоторых вариантах осуществления при хранении при 40°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, девяти месяцев или двенадцати месяцев) количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,5% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% и 0,5%). В некоторых вариантах осуществления НМВ соединения биспецифической антигенсвязывающей молекулы в восстановленном лиофилизированном составе измеряют с помощью SE-UHPLC.

[0077] В некоторых вариантах осуществления стабильность состава характеризуется количеством низкомолекулярных (LMW) соединений белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), или скоростью увеличения количества LMW соединений белка в условиях хранения в различные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления количество LMW соединений определяется в течение одной недели, двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев или двенадцати месяцев хранения при примерно 4°C или 40°C. В некоторых вариантах осуществления скорость увеличения LMW соединений определяется в течение одной недели, двух недель, одного месяца, трех месяцев, шести месяцев или двенадцати месяцев хранения при примерно 4°C или 40°C. В некоторых вариантах осуществления LMW соединений белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), в составе измеряют с помощью капиллярного

электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS). В некоторых вариантах осуществления LMW соединения биспецифической антигенсвязывающей молекулы в составе измеряют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC).

[0078] В некоторых вариантах осуществления менее чем 2% (например, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1% или 0,5%) белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), существует в виде низкомолекулярных (LMW) соединений в восстановленном лиофилизированном составе. В некоторых вариантах осуществления количество LMW соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 2%, (например, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1% или 0,5%) при хранении при 4°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев или шести месяцев). В некоторых вариантах осуществления при хранении при 4°C в течение одного или нескольких месяцев (например, в течение одного месяца, трех месяцев или шести месяцев) количество LMW соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,7% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% или 0,7%). В некоторых вариантах осуществления количество LMW соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 1%, (например, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%) при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев). В некоторых вариантах осуществления при хранении при 40°C в течение одной или нескольких недель (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев) количество LMW соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,1% до 0,7% (например, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6% или 0,7%). В некоторых вариантах осуществления LMW соединения биспецифической антигенсвязывающей молекулы в восстановленном лиофилизированном составе измеряют с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). В некоторых вариантах осуществления LMW соединения биспецифической антигенсвязывающей молекулы в восстановленном лиофилизированном составе измеряют с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS).

[0079] В некоторых вариантах осуществления процент белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE) (т. е. соединения, демонстрирующие главный пик), в восстановленном лиофилизированном составе составляет более чем 95% от общего содержания белка в составе.

[0080] В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным при хранении при приблизительно 4°C в течение одного месяца, и количество HMW соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на

от 0,1% до 0,7% (например, 0,1%, или 0,2%, или 0,3%, или 0,4%, или 0,5%, или 0,6%, или 0,7%) при хранении в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным при хранении при приблизительно 4°C в течение трех месяцев, и количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,0% до 0,2% (например, 0%, или 0,1%, или 0,2%) при хранении в течение по меньшей мере трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным при хранении при приблизительно 4°C в течение шести месяцев, и количество НМВ соединений в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается примерно на от 0,0% до 0,4% (например, 0%, или 0,1%, или 0,2%, или 0,3%, или 0,4%) при хранении в течение по меньшей мере шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления НМВ соединения биспецифической антигенсвязывающей молекулы в восстановленном лиофилизированном составе измеряют с помощью SE-UHPLC.

[0081] В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным при хранении при приблизительно 4°C в течение одного месяца, трех месяцев и шести месяцев, и процент белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), составляет более 95% от общего содержания белка. В некоторых вариантах осуществления состав является стабильным при хранении при приблизительно 4°C в течение одного месяца, трех месяцев, шести месяцев, двенадцати месяцев и 48 месяцев, и процент белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE), составляет более 96% от общего содержания белка после восстановления.

[0082] Стабильность состава, описанного в данном документе, может быть также охарактеризована распределением заряда, например, изменением количества вариантов заряда пиков белка, такого как антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула (биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE). Например, в некоторых вариантах осуществления количество кислотного пика (например, дезамидирование, варианты заряда, обладающие относительно более низкой изоэлектрической точкой (pI)) в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 2% (например, 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере одного месяца (например, в течение одного месяца, трех месяцев, шести месяцев или двенадцати месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество основного пика (например, варианты заряда, обладающие относительно высокой pI) в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 6% (например, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере одного месяца (например, в течение одного месяца, трех месяцев, шести месяцев или двенадцати месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном лиофилизированном составе снижается менее чем на 4% (например, 4%,

3,5%, 3%, 2,5%, 2% 1% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном лиофилизированном составе снижается менее чем на 6% (например, 6%, 5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5% 2% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном лиофилизированном составе снижается менее чем на 9% (например, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном лиофилизированном составе снижается менее чем на 9% (например, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере двенадцати месяцев.

[0083] В некоторых вариантах осуществления количество кислотного пика в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 30% (например, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше) при хранении при 40°C в течение по меньшей мере одной недели (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество основного пика (например, варианты заряда, обладающие относительно высокой рI) в восстановленном лиофилизированном составе увеличивается менее чем на 15% (например, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 4%, 4%, 3%, 2%, 1% или меньше) при хранении при 40°C в течение по меньшей мере одной недели (например, в течение одной недели, двух недель, одного месяца или трех месяцев). В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном составе снижается менее чем на 4% (например, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере одного месяца. В некоторых вариантах осуществления количество основного пика в восстановленном лиофилизированном составе снижается менее чем на 6% (например, 6%, 5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2% или меньше) при хранении при 4°C в течение по меньшей мере трех месяцев.

[0084] Составы на основе белков, лиофилизированные способами по настоящему изобретению, демонстрируют более высокую стабильность по сравнению с сопоставимыми жидкими составами на основе белков. Например, стабильность составов на основе белков, содержащих 1 мг/мл биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, 10 mM L-глутаминовой кислоты, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, при pH 4,2, лиофилизированных в соответствии с настоящим изобретением с использованием стадии отжига и затем восстановленных, подвергали капиллярному электрофорезу с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS) для определения степени отщепления, которая произошла после одного месяца хранения при 25°C и при 40°C.

[0085] Способы лиофилизации по настоящему изобретению также преимущественно стабилизируют составы на основе белков как с низкой концентрацией, так и с высокой концентрацией. Например, составы на основе белков по настоящему

изобретению, содержащие 1 мг/мл, 5 мг/мл, 13 мг/мл и 23 мг/мл биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, 10 мМ L-глутаминовой кислоты, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, при pH 4,2, лиофилизированные с применением стадии отжига и затем восстановленные, были подвергнуты SEC-UHPLC после одного месяца хранения при 40°C для определения степени агрегации в составе по процентному содержанию высокомолекулярных соединений (% HMW).

[0086] Неожиданно было обнаружено, что способы лиофилизации по настоящему изобретению, в которых отсутствует стадия отжига, обеспечивают более высокую стабильность состава на основе белка по сравнению со способами лиофилизации, включающими стадию отжига. Например, составы на основе белков, содержащие 15 мг/мл, 20 мг/мл или 23 мг/мл биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, 10 мМ L-глутаминовой кислоты, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, при pH 4,2, подвергнутые лиофилизации со стадией отжига и без нее, после восстановления были подвергнуты SE-UHPLC для определения количества агрегации в каждом образце.

[0087] Следующие примеры приведены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0088] Общие процедуры

[0089] *С помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS) белки разделяли на основе различий в их гидродинамическом размере в восстанавливающих и денатурирующих условиях. Соединения белка связывали с SDS, анионным детергентом, и электрокинетическим способом вводили в капилляр из плавленого кремния без покрытия, заполненный гелевым буфером с SDS. Через капилляр подается электрическое напряжение, под действием которого белки, покрытые SDS, разделяются в зависимости от разницы их миграции в растворе на основе гидрофильного полимера. Белки выявляли с помощью детектора с фотодиодной матрицей (PDA) по мере их прохождения через окно для УФ-выявления. Чистоту оценивали посредством определения скорректированной по процентной доле площади пика обогащенного компонента. Способ на основе rCE-SDS позволяет разделять тяжелую цепь (HC), легкую цепь (LC), негликозилированную HC (NGHC) и другие соединения минорных пиков и групп пиков в восстанавливающих условиях. Капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия (rCE-SDS) проводили путем инкубации образцов в восстанавливающем геле SDS-MW в течение 10 минут при 70 C +/- 10, затем от 60 до 80 C в течение 10 минут, после чего оставляли охлаждаться до комнатной температуры. После инкубации образцы центрифугировали, а затем электрокинетическим способом вводили в 67-см капилляр из плавленого кремния без покрытия с внутренним диаметром 50 мкм с использованием электрокинетического способа ввода. Эффективная длина капилляра составляла 30,2 см. Разделение проводили с использованием геля CE-*

SDS (Beckman Coulter, Brea, Calif.) и эффективного напряжения 30 кВ. Определение проводили при длине волны 220 нм с помощью УФ-поглощения.

[0090] *Визуальный осмотр полученной лиофилизированной массы.* После завершения цикла полученные высушенные массы оценивали путем визуального осмотра на предмет наличия признаков макроскопического разрушения и общего качества. Полученные массы ВІТЕ В были признаны приемлемыми и на фигуре 1 показаны фотографии, сделанные с нескольких ракурсов. Визуально не поврежденная структура продукта служит предварительным признаком того, что параметры цикла обеспечивают достаточное высушивание и однородность по всем флаконам с образцами.

[0091] *Эксклюзионная ультравысокопроизводительная жидкостная хроматография (SE-UHPLC).* SEC-UHPLC разделяет белки на основании отличий в их гидродинамических объемах. Молекулы с большими гидродинамическими объемами элюировали ранее, чем молекулы с меньшими объемами. Образцы загружали на колонку SE-UHPLC (ВЕН200, 4,6 × 150 мм (Waters Corporation, 186005226)), разделяли в изократическом режиме и элюент контролировали по поглощению в УФ. Чистоту определяли путем расчета процентного содержания каждого отдельного компонента по сравнению с общей интегрированной площадью. Использовали следующие настройки SE-UHPLC: Скорость потока: 0,4 мл/мин., время прогона: 9 мин., УФ-обнаружение: 220 нм (280 нм является обычной длиной волны, выбранной для белков, включая антитела, в то время как большинство биспецифических молекул обнаруживаются при 220 нм). Температура колонки: температура окружающей среды; целевая загрузка белка: 10 мкг, проточная кювета, совместимая с белками: 5 мм. После определения того, что приемлемое содержание влаги достигается при использовании этого цикла, флаконы с высушенным продуктом ВІТЕ В подвергали испытанию на стабильность при 5°C, 25°C и 40°C общей длительностью четыре недели. В течение этого времени через две и четыре недели флаконы с образцами извлекали и проводили оценку их агрегации с помощью SE-UHPLC. Образцы восстанавливали, перемешивали путем вращения сосуда и вводили в чистом виде. Значения относительной площади % для высокомолекулярных (НМВ) соединений наносили на график в зависимости от времени на фигуре 2, и эти данные свидетельствуют об отсутствии нестабильности касательно агрегации в течение всего исследования, что подтверждает вывод об отсутствии агрегации при использовании предложенного цикла.

[0092] *Титрование по методу Карла Фишера (содержание влаги).* Для более точной оценки эффективности высушивания по предлагаемому циклу проводили оценку содержания влаги в полученных массах с помощью метода титрования по Карлу Фишеру. Хотя критерии приемлемости допускают содержание влаги до 5% вес/вес, наиболее предпочтительным является содержание влаги менее 2%. Полученные массы ВІТЕ В, высушенные с использованием цикла по настоящему изобретению, сравнивали с ранее полученными массами ВІТЕ, известными из уровня техники, и пришли к выводу, что содержание влаги является как приемлемым, так и конкурентоспособным, как показано в таблице 1.

[0093] Таблица 1. Содержание влаги в ViTE В после обоих условий лиофилизации.

Тип цикла	Содержание влаги (% вес/вес)
Цикл из предыдущего поколения для биспецифических антигенсвязывающих молекул	0,56 ± 0,07
Сокращенный цикл для биспецифических антигенсвязывающих молекул	0,33

[0094] *Состав на основе белка.* Получали составы на основе белков, содержащие интактную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу в концентрации 1 мг/мл, 5 мг/мл, 13 мг/мл или 23 мг/мл, 10 мМ L-глутаминовой кислоты, 9% (вес/объем) сахарозы, 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, при pH 4,2. Состав на основе белка вводили во флакон для лиофилизации (без стадии отжига).

ПРИМЕР 1

Лиофилизация состава на основе биспецифической антигенсвязывающей молекулы без стадии отжига

[0095] Флаконы, соответствующие условиям платформы F1H ViTE, состоящие из стеклянных флаконов Schott ISO 6R, заполняли 1,3 мл раствора и закупоривали эластомерным фторполимером D-777 с диаметром 20 мм. Для целей разработки цикла и аналитического контроля во всех случаях использовали состав буфера, обозначенный как G42SuT (10 мМ глутаминовой кислоты, 9,0% вес/вес сахарозы, 0,01% полисорбата 80, pH 4,2). Флаконы с образцами лекарственного продукта ViTE В также составлены в G42SuT с концентрацией белка 1 мг/мл. Для способов SE-UHPLC ViTE В использовали в целях обеспечения пригодности системы. В качестве стандартов для титрования по методу Карла Фишера использовали стандарты содержания влаги 1% и 5%.

[0096] Ускоренный цикл лиофилизации

[0097] Конечное время составляет приблизительно 32,7 часа, что примерно на 67% меньше по времени по сравнению с обычными циклами лиофилизации. Кроме того, в этом цикле отсутствовала необязательная фаза, известная как отжиг, которая, как считается, лучше способствует однородности высушивания, но недавно была обнаружена корреляция с агрегацией продукта в лиофилизированных молекулах типа ViTE.

[0098] Жидкий состав на основе белка получали как описано выше и вводили в камеру лиофилизации. Камеру охлаждали от температуры загрузки при 5°C до -45°C со скоростью 0,5°C/мин. и выдерживали при -45°C в течение 2 часов. Затем осуществляли линейное повышение температуры при 0,3°C/мин. и первичное высушивание осуществляли при температуре приблизительно -27°C и при давлении в камере 100 мторр в течение 16,7 часа. Вторичное высушивание осуществляли при 25°C после линейного повышения со скоростью 0,4°C/мин. и при давлении 70 мторр в течение 8,3 часа при 70

мторр. Для обеспечения возможности укупоривания флаконов температуру в камере снижали до 5°C, а камеру лиофилизации азиривали азотом при 500 мторр. Флакон, содержащий лиофилизированный состав на основе белка, извлекали из камеры лиофилизации и хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки и анализа. Общее время цикла с использованием цикла по настоящему изобретению составляло 32,7 ч. по сравнению с временем цикла более 70 ч. (точно: 72,7 ч.) с использованием предыдущих условий циклирования. В таблице 2 приведены параметры ускоренного и установленного циклов лиофилизации.

[0099] Таблица 2

Фаза цикла	Стадия цикла	Цикл из предыдущего поколения	Ускоренный цикл
		Параметры	
Замораживание	Температура загрузки	5°C	5°C
	Скорость линейного изменения при замораживании	0,5°C/мин.	0,5°C/мин.
	Температура замораживания	-45°C	-45°C
	Время замораживания	2 ч.	2 ч.
	Линейное изменение при нагревании для отжига	0,5°C/мин.	-
	Температура отжига	-12°C	-
	Время отжига	5 ч.	-
	Температура замораживания после отжига	-45°C	-
	Время замораживания после отжига	2 ч.	-
Первичное высушивание	Линейное изменение при нагревании при первичном высушивании	0,33°C/мин.	0,3°C/мин.
	Температура первичного высушивания	-25°C	-27°C

	Давление в камере при первичном высушивании	70 мторр	100 мторр
	Время первичного высушивания	42 ч.	16,7 ч.
Вторичное высушивание	Скорость линейного изменения при нагревании при вторичном высушивании	0,1°C/мин.	0,4°C/мин.
	Температура вторичного высушивания	30°C	25°C
	Давление в камере при вторичном высушивании	70 мторр	70 мторр
	Время вторичного высушивания	8 ч.	8,3 ч.
Условия хранения	Температура хранения	5°C	5°C
	Давление в камере при закупоривании	500 торр	500 торр
	Общее время цикла	72,7 ч.	32,7 ч.

[0100] Вышеприведенное описание приведено только для ясности понимания, и оно не должно подразумевать каких-либо нежелательных ограничений, так как модификации в пределах объема настоящего изобретения могут быть очевидны для средних специалистов в данной области техники.

[0101] На протяжении всего данного описания и нижеследующей формулы изобретения, если по контексту не требуется иное, слово «предусматривать» и его варианты, такие как «предусматривает» и «предусматривающий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий.

[0102] Следует понимать, что при описании диапазона значений описываемая характеристика может представлять собой отдельное значение, которое находится в пределах диапазона. Например, «рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6» могло бы составлять без ограничения рН 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5 и т. п. и любое значение между такими значениями. Более того, выражение «рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6» не следует истолковывать как означающее то, что рН рассматриваемого состава варьируется на 2 единицы рН в диапазоне от рН 4 до рН 6 во время хранения, но следует понимать как то, что значение рН раствора может быть

выбрано в этом диапазоне, и при этом рН остается буферизованным при приблизительно данном значении рН.

[0103] Если используется термин «приблизительно», он означает указанное число плюс или минус 5%, 10%, 15% или больше от указанного числа. Фактическое предполагаемое отклонение определяется по контексту.

[0104] На протяжении всего данного описания, где композиции описаны как содержащие компоненты или материалы, предполагается, что композиции также могут по сути состоять или состоять из любой комбинации перечисленных компонентов или материалов, если не указано иное. Аналогичным образом, если способы описаны как включающие конкретные стадии, предполагается, что способы также могут по сути состоять или состоять из любой комбинации перечисленных стадий, если не указано иное. Настоящее изобретение, раскрытое в данном документе иллюстративным образом, может применяться на практике соответствующим образом при отсутствии любого элемента или стадии, которые конкретно не раскрыты в данном документе.

[0105] Осуществление на практике способа, раскрытого в данном документе, и его индивидуальных стадий может проводиться вручную и/или с применением автоматической обработки, обеспечиваемой с помощью электронного оборудования. Хотя способы были описаны со ссылкой на конкретные варианты осуществления, средний специалист в данной области техники легко поймет, что могут применяться другие пути выполнения действий, ассоциированных с указанными способами. Например, порядок различных стадий может быть изменен без отклонения от объема или сущности способа, если не указано иное. Кроме того, некоторые из отдельных стадий могут быть объединены, удалены или дополнительно подразделены на дополнительные стадии.

[0106] Все патенты, публикации и ссылки, цитируемые в данном документе, настоящим полностью включены посредством ссылки. В случае противоречия между настоящим изобретением и включенными патентами, публикациями и ссылками настоящее раскрытие должно иметь преимущественную силу.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения лиофилизированного состава, при этом способ включает:

(а) охлаждение камеры лиофилизации, в которой содержится жидкий состав, содержащий белок, сахарид и поверхностно-активное вещество, до температуры в диапазоне от приблизительно -35°C до приблизительно -50°C с получением замороженного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -40°C до приблизительно -50°C в течение периода времени от приблизительно 1,5 часа до приблизительно 5,0 часа;

(b) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно -30°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр с получением первично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно -30°C до приблизительно -20°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр в течение периода времени от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов;

(с) нагревание камеры до температуры в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C с получением вторично высушенного состава и выдерживание камеры при температуре в диапазоне от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C и при давлении в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр в течение периода времени от приблизительно 5 часов до приблизительно 12 часов с получением лиофилизированного состава;

где жидкий состав характеризуется рН приблизительно 3-7 и не содержит маннита, и в способе отсутствует стадия отжига.

2. Способ по п. 1, где охлаждение на стадии (а) осуществляют до температуры приблизительно -45°C .

3. Способ по п. 1 или п. 2, где охлаждение на стадии (а) осуществляют со скоростью от приблизительно $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$

4. Способ по п. 3, где охлаждение на стадии (а) осуществляют со скоростью приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$

5. Способ по любому из пп. 1-4, где выдерживание на стадии (а) осуществляют при температуре приблизительно -45°C .

6. Способ по любому из пп. 1-5, где выдерживание на стадии (а) осуществляют в течение периода времени от 1,5 часа до 5 часов.

7. Способ по п. 6, где выдерживание на стадии (а) осуществляют в течение приблизительно 2-3 часов.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где нагревание на стадии (b) осуществляют до температуры от приблизительно -25°C до -30°C .

9. Способ по любому из пп. 1-8, где нагревание на стадии (b) осуществляют со скоростью в диапазоне от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$

10. Способ по п. 9, где нагревание на стадии (b) осуществляют со скоростью в диапазоне от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ до приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$

11. Способ по п. 10, где нагревание на стадии (b) осуществляют со скоростью приблизительно $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где нагревание на стадии (b) осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр.

13. Способ по п. 12, где нагревание на стадии (b) осуществляют при давлении приблизительно 100 мторр.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где выдерживание на стадии (b) осуществляют при температуре от приблизительно -25°C до приблизительно -30°C .

15. Способ по любому из пп. 1-14, где выдерживание на стадии (b) осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 75 мторр до приблизительно 125 мторр.

16. Способ по п. 15, где выдерживание на стадии (b) осуществляют при давлении приблизительно 100 мторр.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где выдерживание на стадии (b) осуществляют в течение периода времени от приблизительно 10 часов до приблизительно 25 часов.

18. Способ по п. 17, где выдерживание на стадии (b) осуществляют в течение приблизительно 17 часов.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где нагревание на стадии (c) осуществляют до температуры приблизительно 25°C .

20. Способ по любому из пп. 1-19, где скорость линейного изменения при нагревании на стадии (c) соответствует скорости в диапазоне не более приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

21. Способ по п. 20, где скорость линейного изменения при нагревании на стадии (c) соответствует скорости в диапазоне от приблизительно $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до приблизительно $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

22. Способ по п. 21, где нагревание на стадии (c) осуществляют со скоростью приблизительно $0,4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где выдерживание на стадии (c) осуществляют при температуре приблизительно 25°C .

24. Способ по любому из пп. 1-23, где выдерживание на стадии (c) осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 50 мторр до приблизительно 100 мторр.

25. Способ по п. 24, где выдерживание на стадии (c) осуществляют при давлении приблизительно 70 мторр.

26. Способ по любому из пп. 1-25, где выдерживание на стадии (c) осуществляют в течение приблизительно 8 часов.

27. Способ по любому из пп. 1-26, где белок представляет собой антитело.

28. Способ по любому из пп. 1-26, где белок представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу.

29. Способ по п. 28, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическую антигенсвязывающую молекулу с увеличенным периодом полужизни (HLE).

30. Способ по п. 29, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.

31. Способ по п. 30, где биспецифическая антигенсвязывающая молекула с HLE содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 97.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где белок присутствует в жидком составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл.

33. Способ по п. 32, где белок присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 70 мг/мл.

34. Способ по п. 33, где белок присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 30 мг/мл.

35. Способ по п. 34, где белок присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл.

36. Способ по п. 35, где белок присутствует в концентрации приблизительно 1 мг/мл.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где жидкий состав на стадии (а) характеризуется рН приблизительно 4-6.

38. Способ по любому из пп. 1-37, где жидкий состав на стадии (а) дополнительно содержит буфер.

39. Способ по п. 38, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер, фосфатный буфер, 2-(N-морфолино)этансульфонатный буфер или любую их комбинацию.

40. Способ по п. 39, где буфер содержит глутаминовую кислоту.

41. Способ по любому из пп. 38-40, где буфер присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ.

42. Способ по п. 41, где буфер присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ.

43. Способ по п. 42, где буфер присутствует в концентрации приблизительно 10 мМ.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

45. Способ по п. 44, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу или любую их комбинацию.

46. Способ по п. 45, где сахарид представляет собой сахарозу.

47. Способ по любому из пп. 1-46, где сахарид присутствует в жидком составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 15% (вес/объем).

48. Способ по п. 47, где сахарид присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 6% до 12% (вес/объем).

49. Способ по п. 48, где сахарид присутствует в концентрации приблизительно 9% (вес/объем).

50. Способ по любому из пп. 1-49, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полксамер 188, полксамер 407, тритон X-100, полиоксиэтилен, PEG 3350, PEG 4000 или их комбинацию.

51. Способ по п. 50, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

52. Способ по любому из пп. 1-51, где поверхностно-активное вещество присутствует в жидком составе в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001% до 0,5% (вес/объем).

53. Способ по п. 52, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации, находящейся в диапазоне от приблизительно 0,001% до 0,01% (вес/объем).

54. Способ по п. 53, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации приблизительно 0,01% (вес/объем).

55. Способ по любому из пп. 1-54, где жидкий состав на стадии (а) характеризуется рН от приблизительно 4 до приблизительно 5.

56. Способ по любому из пп. 1-55, где жидкий состав на стадии (а) характеризуется рН приблизительно 4,2 и содержит приблизительно 10 мМ L-глутаминовой кислоты, приблизительно 9,0% (вес/объем) сахарозы и приблизительно 0,010% (вес/объем) полисорбата 80.

57. Способ по любому из пп. 1-56, где лиофилизированный состав после восстановления демонстрирует увеличение процентного содержания высокомолекулярных соединений на 0,5% или меньше после хранения в течение одного месяца при 40°C.

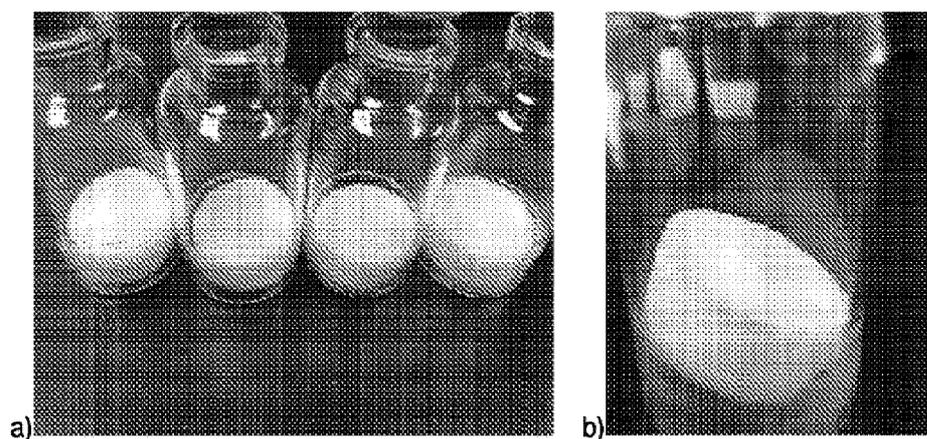
58. Способ по п. 57, где лиофилизированный состав после восстановления демонстрирует увеличение процентного содержания высокомолекулярных соединений на 0,3% или меньше после хранения в течение одного месяца при 40°C.

59. Лиофилизированный состав на основе белка, полученный способом по любому из пп. 1-58.

По доверенности

ФИГ. 1

Фигура 1. Макроскопическое определение качества полученной массы с использованием ускоренного цикла



ФИГ. 2

Фигура 2. Соединения агрегатов из полученных высушенных масс, определенные с помощью SE-UHPLC

