



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114404371 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 29

(21) 申请号	202210095360.9	A61K 47/62 (2017.01)
(22) 申请日	2016.12.16	A61K 47/26 (2006.01)
(30) 优先权数据		A61K 47/18 (2006.01)
	62/268,259 2015.12.16 US	A61K 47/22 (2006.01)
		A61P 9/10 (2006.01)
(62) 分案原申请数据		A61P 27/02 (2006.01)
	201680072951.7 2016.12.16	A61P 35/00 (2006.01)
(71) 申请人	瑞泽恩制药公司	
地址	美国纽约州	
(72) 发明人	P·博德德基 H·陈	
(74) 专利代理机构	北京市金杜律师事务所	
	11256	
代理人	陈文平 谌侃	
(51) Int.Cl.		
	A61K 9/16 (2006.01)	
	A61K 38/17 (2006.01)	

权利要求书3页 说明书38页 附图4页

(54) 发明名称

制造蛋白质微粒的组合物和方法

(57) 摘要

提供含有治疗性蛋白质和任选的赋形剂以及生物相容且可生物降解的聚合物的包衣的微米级的颗粒,以及制备和使用那些微粒的方法。配制成微米级颗粒的药物粉末的治疗性蛋白质在延长的时间段内保持稳定并且适于聚合物包衣以在生理条件下延长释放和稳定性。

1. 一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:
 - a. 使水溶液雾化,所述水溶液包含:
 - i. 质量比在1:5-2:5之间的热稳定剂和50mg/mL至180mg/mL的含Fc的蛋白,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合;和
 - ii. 0.03-0.1% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯;其中以100°C-130°C的入口温度和55°C的出口温度进行喷雾;和
 - b. 施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末,其中对所述经雾化的水溶液施加热,使得所得到的经配制的药物粉末具有3%-6%之间的水含量,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥,所述粉末包含直径<10 μ m的球形颗粒。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述含Fc的蛋白是捕获剂蛋白。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述水溶液包含0.1-2% (w/v) 所述热稳定剂。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述水溶液不包含缓冲剂。
6. 如权利要求4所述的方法,其中所述水溶液包含0.5mM-10mM的缓冲剂。
7. 如权利要求4所述的方法,其中所述水溶液包含0.01-0.2% (w/v) 的非离子表面活性剂。
8. 如权利要求1或2所述的方法,其还包括将所述经配制的药物粉末混悬在包含生物可降解聚合物的有机溶液中;和喷雾干燥所述混悬液以形成经包衣的经配制的药物粉末,其中所述经配制的药物粉末在形成所述经包衣的经配制的药物粉末之前不经受二次干燥。
9. 一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:
 - a. 使水溶液雾化,所述水溶液包含:
 - i. 小于300摩尔热稳定剂/摩尔含Fc的蛋白的摩尔比的热稳定剂和50mg/mL至180mg/mL的含Fc的蛋白,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合;和
 - ii. 0.03-0.1% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯;其中以100°C-130°C的入口温度和55°C的出口温度进行喷雾;和
 - b. 施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末,其中对所述经雾化的水溶液施加热,使得所得到的经配制的药物粉末具有3%-6%之间的水含量,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥,所述粉末包含直径<10 μ m的球形颗粒。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述含Fc的蛋白是捕获剂蛋白。
11. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。
12. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述热稳定剂选自由甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。
13. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述水溶液包含0.1-2% (w/v) 所述热稳定剂。
14. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述水溶液不包含缓冲剂。
15. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述水溶液包含0.5mM-10mM的缓冲剂。
16. 如权利要求9或10所述的方法,其中所述水溶液包含0.01-0.2% (w/v) 的非离子表面活性剂。

17. 如权利要求9或10所述的方法,其还包括将所述经配制的药物粉末混悬在包含生物可降解聚合物的有机溶液中;和喷雾干燥所述混悬液以形成经包衣的经配制的药物粉末,其中所述经配制的药物粉末在形成所述经包衣的经配制的药物粉末之前不经受二次干燥。

18. 一种经配制的药物粉末,其包含60%-97% (w/w) 的含Fc的蛋白和3%-40% (w/w) 的热稳定剂,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合,并且其中所述经配制的药物粉末包含3%-6%的水,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥。

19. 如权利要求18所述的经配制的药物粉末,其还包含0.5-10mM的缓冲剂。

20. 如权利要求19所述的经配制的药物粉末,其中所述缓冲剂选自磷酸盐、组氨酸和乙酸盐组成的组。

21. 如权利要求18所述的经配制的药物粉末,其中所述含Fc的蛋白是捕获剂蛋白。

22. 如权利要求18或21所述的经配制的药物粉末,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。

23. 如权利要求18或21所述的经配制的药物粉末,其中所述热稳定剂选自甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。

24. 如权利要求18或21所述的经配制的药物粉末,其包含71-75% (w/w) 含Fc的蛋白、14-15% (w/w) 甘露糖醇、14-15% (w/w) 异亮氨酸或脯氨酸、2-2.5% (w/w) 缓冲剂和3-8% (w/w) 水。

25. 如权利要求18或21所述的经配制的药物粉末,其还包含聚合物包衣。

26. 一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:

a. 使水溶液雾化,所述水溶液包含:

i. 热稳定剂与蛋白质量比在1:5-2:5之间的热稳定剂和50mg/mL至180mg/mL的包含可溶性受体的蛋白,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、

甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合;和

ii. 0.03-0.1% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯;其中以100°C-130°C的入口温度和55°C的出口温度进行喷雾;和

b. 施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末,其中对所述经雾化的水溶液施加热,使得所得到的经配制的药物粉末具有3%-6%之间的水含量,

其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥,所述粉末包含直径<10μm的球形颗粒。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述蛋白是捕获剂型蛋白。

28. 一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:

a. 使水溶液雾化,所述水溶液包含:

i. 小于300摩尔热稳定剂/摩尔包含可溶性受体的蛋白的摩尔比的热稳定剂和50mg/mL至180mg/mL的包含可溶性受体的蛋白,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合;和

ii. 0.03-0.1% (w/v) 聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯;其中以100°C-130°C的入口温度和55°C的出口温度进行喷雾;和

b. 施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末,其中对所述经雾化的水溶液施加热,使得所得到的经配制的药物粉末具有3%-6%之间的水含量,

其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥,所述粉末包含直径<10μm的球形颗粒。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述蛋白是捕获剂蛋白。

30. 一种经配制的药物粉末,其包含60%-97% (w/w) 的包含可溶性受体的蛋白和3%-40% (w/w) 的热稳定剂,其中热稳定剂选自蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合,并且其中所述经配制的药物粉末包含3%-6%的水,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥。

31. 如权利要求30所述的经配制的药物粉末,其中所述蛋白是捕获剂蛋白。

制造蛋白质微粒的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2016年12月16日、申请号为201680072951.7,发明名称为“制造蛋白质微粒的组合物和方法”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 领域

[0003] 本发明总体上涉及配制在延长的时间段内稳定的蛋白质的组合物和方法。本发明特别涉及制备治疗性蛋白质制剂的组合物和方法,所述制剂在延长的时间段内在环境和生理温度下保持稳定和生物活性。

[0004] 背景

[0005] 治疗性大分子诸如抗体和受体Fc-融合蛋白必须以不仅使得分子适于施用给患者而且还在储存期间和同时在施用位点处保持其稳定性的方式配制。例如,在液体溶液中的治疗性蛋白质(例如,抗体)易于降解、聚集和/或经受不希望的化学修饰,除非溶液经适当配制。在制备治疗性蛋白质制剂时,还必须顾及到除了稳定性之外的考虑事项。此类附加考虑事项的实例包括给定制剂可适应的溶液粘度和抗体浓度。当配制用于延长释放的治疗性蛋白质时,必须非常小心以获得制剂,所述制剂随着时间推移且在储存和生理温度下保持稳定、含有足够浓度的抗体或其它治疗性生物制剂并且具有使制剂能够方便地施用给患者的其它性质。

[0006] 生物分子的液体制剂通常被设计成当冷冻或冷藏时提供长期稳定性,但常常不能在室温下提供长期稳定性。本领域已知的用于保存生物分子的稳定性和生物活性/治疗活性的一种解决方案是冷冻干燥或另外地冻干分子。冻干可提供在环境温度下相对较长时间段内保持相对稳定的干燥“滤饼”。室温稳定性可能在世界各地的生物治疗药物的储存和分配中尤为重要,特别是在电力和制冷不可靠的地方。

[0007] 药物制剂领域中另一个新出现的问题是需要增加浓度的治疗性蛋白质以促进在少量空间中递送大量药物。通过减少有助于稳定蛋白质的赋形剂的量的相互需要,使每单位体积的蛋白质药物量最大化的问题进一步恶化。随着蛋白质药物与稳定剂的摩尔比增加,在使蛋白质不稳定的风险下最大化蛋白质的量。

[0008] 美国专利申请公开No.2016/0176986A1描述了在非水溶剂中的高浓度(≥ 200 mg/mL) IgG1制剂。该制剂含有混悬于经设计用于皮下递送的非水性溶液中的喷雾干燥的IgG1颗粒。喷雾干燥的颗粒含有海藻糖(作为稳定剂)和IgG1分子,其重量-与-重量比为1:2。

[0009] Shire等人(J.Pharm.Sci.,第93卷,第6期,2004年6月,1390-1402)描述了通过冻干开发高浓度蛋白质制剂。Shire将冻干保护剂与蛋白质的最佳摩尔比描述为300:1或更高。具有冻干保护剂与抗体的500:1的摩尔比的抗体制剂被描述为在室温下具有显著的稳定性,但具有不希望的高渗性。用较低的冻干保护剂(250:1的冻干保护剂与抗体摩尔比)配制的相同抗体显示出改善的和有用的张力,但稳定性大大降低。折衷的250:1制剂需要在2-8℃下储存以维持合理的稳定性。

[0010] Ajmera和Scherliesz(Int.J.Pharm.,第463卷,2014,98-107)描述了在喷雾干燥期间使用氮稠密氨基酸精氨酸和组氨酸来稳定过氧化氢酶。稳定作用可归因于氮介导的氢

键合。用于有效稳定的氨基酸与过氧化氢酶的重量-与-重量比为1:1或2:1。

[0011] 概述

[0012] 一方面,本发明提供了制造经配制的药物粉末的方法。根据该方面,将含有质量比为1:5-2:5或在1:5-2:5之间的热稳定剂和糖蛋白的水溶液雾化。然后施加热至经雾化的水溶液以蒸发来自雾化液滴的水并形成蛋白质粉末。在一个实施方案中,随后用生物可降解聚合物对包含蛋白质粉末的单个颗粒包衣。

[0013] 一方面,本发明提供了制造经配制的药物粉末的方法。根据该方面,将含有摩尔比小于300:1的热稳定剂和糖蛋白的水溶液雾化。然后施加热至经雾化的水溶液以蒸发来自雾化液滴的水并形成蛋白质粉末。在一个实施方案中,随后用生物可降解聚合物对包含蛋白质粉末的单个颗粒包衣。

[0014] 一方面,本发明提供了制造经配制的药物粉末的方法。根据该方面,将含有糖蛋白而不含热稳定剂的水溶液雾化。然后施加热至经雾化的水溶液以蒸发来自雾化液滴的水并形成蛋白质粉末。在一个实施方案中,随后用生物可降解聚合物对包含蛋白质粉末的单个颗粒包衣。

[0015] 一方面,本发明提供含有约60%-97% (w/w) 糖蛋白和约3%-40% (w/w) 热稳定剂的经配制的药物粉末。根据该方面,经配制的药物粉末不是干透的,并且糖蛋白的高分子量物质的量的百分比变化小于5%。在一个实施方案中,粉末的单个蛋白质颗粒具有生物可降解聚合物包衣。

[0016] 本申请还具体涉及以下项目。

[0017] 1. 一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:

[0018] a. 使包含质量比为1:5-2:5或在1:5-2:5之间的热稳定剂和糖蛋白的水溶液雾化;
和

[0019] b. 施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末。

[0020] 2. 如项目1所述的方法,其中所述经配制的药物粉末不是干透的。

[0021] 3. 如项目2所述的方法,其中所述经配制的药物粉末包含约3%至约10% (w/w) 的水。

[0022] 4. 如项目1所述的方法,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥。

[0023] 5. 如项目1所述的方法,其中所述热稳定剂包含蔗糖或海藻糖。

[0024] 6. 如项目1所述的方法,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。

[0025] 7. 如项目1所述的方法,其中所述热稳定剂选自由甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。

[0026] 8. 如项目1所述的方法,其中所述水溶液包含2-200mg/ml所述糖蛋白和0.1-2% (w/v) 所述热稳定剂。

[0027] 9. 如项目8所述的方法,其中所述热稳定剂包含(i) 甘露糖醇和(ii) 异亮氨酸或脯氨酸。

[0028] 10. 如项目8所述的方法,其中所述水溶液不包含缓冲剂。

[0029] 11. 如项目8所述的方法,其中所述水溶液包含0.5mM-10mM的缓冲剂。

[0030] 12. 如项目8所述的方法,其中所述水溶液包含0.01-0.2% (w/v) 的非离子表面活性剂。

[0031] 13.如项目1所述的方法,其还包括将所述经配制的药物粉末混悬在包含生物可降解聚合物的有机溶液中;和喷雾干燥所述混悬液以形成经包衣的经配制的药物粉末,其中所述经配制的药物粉末在形成所述经包衣的经配制的药物粉末之前不经受二次干燥。

[0032] 14.一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:

[0033] a.使水溶液雾化,所述水溶液包含小于300摩尔所述热稳定剂/摩尔糖蛋白的摩尔比的热稳定剂和糖蛋白;和

[0034] b.施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末。

[0035] 15.如项目14所述的方法,其中所述经配制的药物粉末不是干透的。

[0036] 16.如项目15所述的方法,其中所述经配制的药物粉末包含约3%至约10% (w/w) 的水。

[0037] 17.如项目14所述的方法,其中所述经配制的药物粉末不经受二次干燥。

[0038] 18.如项目14所述的方法,其中所述热稳定剂包含蔗糖或海藻糖。

[0039] 19.如项目14所述的方法,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。

[0040] 20.如项目14所述的方法,其中所述热稳定剂选自由甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。

[0041] 21.如项目13所述的方法,其中所述水溶液包含2-200mg/ml所述糖蛋白和0.1-2% (w/v) 所述热稳定剂。

[0042] 22.如项目21所述的方法,其中所述热稳定剂包含(i) 甘露糖醇和(ii) 异亮氨酸或脯氨酸。

[0043] 23.如项目21所述的方法,其中所述水溶液不包含缓冲剂。

[0044] 24.如项目21所述的方法,其中所述水溶液包含0.5mM-10mM的缓冲剂。

[0045] 25.如项目21所述的方法,其中所述水溶液包含0.01-0.2% (w/v) 的非离子表面活性剂。

[0046] 26.如项目14所述的方法,其还包括将所述经配制的药物粉末混悬在包含生物可降解聚合物的有机溶液中;和喷雾干燥所述混悬液以形成经包衣的经配制的药物粉末,其中所述经配制的药物粉末在形成所述经包衣的经配制的药物粉末之前不经受二次干燥。

[0047] 27.一种制造经配制的药物粉末的方法,所述方法包括:

[0048] a.使包含糖蛋白而不含热稳定剂的水溶液雾化;和

[0049] b.施加热至所述经雾化的水溶液以形成所述经配制的药物粉末。

[0050] 28.一种经配制的药物粉末,其包含约60%-97% (w/w) 的糖蛋白和约3%-40% (w/w) 的热稳定剂,其中所述经配制的药物粉末不是干透的且所述糖蛋白的高分子量物质的量的变化百分比小于5%。

[0051] 29.如项目28所述的经配制的药物粉末,其包含至少3%的水。

[0052] 30.如项目29所述的经配制的药物粉末,其中所述糖蛋白、热稳定剂或水缓冲所述经配制的药物粉末。

[0053] 31.如项目28所述的经配制的药物粉末,其还包含0.5-10mM的缓冲剂。

[0054] 32.如项目31所述的经配制的药物粉末,其中所述缓冲剂选自由磷酸盐、组氨酸和乙酸盐组成的组。

[0055] 33.如项目28所述的经配制的药物粉末,其中所述热稳定剂包含蔗糖或海藻糖。

[0056] 34.如项目28所述的经配制的药物粉末,其中所述热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。

[0057] 35.如项目28所述的经配制的药物粉末,其中所述热稳定剂选自由甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。

[0058] 36.如项目28所述的经配制的药物粉末,其包含71-75% (w/w) 糖蛋白、14-15% (w/w) 甘露糖醇、14-15% (w/w) 异亮氨酸或脯氨酸、2-2.5% (w/w) 缓冲剂和3-8% (w/w) 水。

[0059] 37.如项目28所述的经配制的药物粉末,其中所述糖蛋白是抗体或受体-Fc-融合蛋白。

[0060] 38.如项目28所述的经配制的药物粉末,其还包含聚合物包衣。

[0061] 附图

[0062] 图1是描绘如通过微流成像 (Microflow Imaging, MFI) 测量的按混悬于乙醇中的喷雾干燥颗粒的体积计的等效圆直径 (ECD) 中颗粒的尺寸分布的线图。在不同入口温度下喷雾干燥颗粒:100°C (点划线);110°C (虚线);120°C (点线);和130°C (实线)。

[0063] 图2是描绘如通过微流成像 (MFI) 测量的按混悬于乙醇中的喷雾干燥颗粒的体积计的等效圆直径 (ECD) 中的尺寸分布的线图。喷雾干燥前的制剂含有0% (点划线)、0.03% (虚线) 和0.1% (实线) w/v 聚山梨醇酯20 (PS20)。

[0064] 图3是描绘如通过微流成像 (MFI) 测量的按混悬于乙醇中的喷雾干燥颗粒的纵横比计的数量分布的直方图。纵横比等于1表示球形颗粒形态。喷雾干燥前的制剂含有0% (点画填充直方图)、0.03% (对角影线填充直方图) 和0.1% (实心填充直方图) w/v 聚山梨醇酯20 (PS20)。

[0065] 图4是描绘如通过微流成像 (MFI) 测量的按混悬于乙醇中的喷雾干燥颗粒的体积计的等效圆直径 (ECD) 中的尺寸分布的线图。低溶质过程 (用虚线描绘) 使用的溶质浓度比标准过程低约10倍 (用实线描绘)。

[0066] 图5是描绘如通过微流成像 (MFI) 测量的按喷雾干燥颗粒 (没有聚合物包衣的蛋白质微粒;虚线) 和喷雾包衣的颗粒 (聚合物包衣的蛋白质微粒;实线) 的体积计的等效圆直径 (ECD) 中的尺寸分布的线图。

[0067] 图6,图A和B是描绘如通过SEC-UPLC测量的在50°C下作为时间平方根的函数的高分子量物质 (HMW) 形成速率的点图。根据其热稳定剂:蛋白质重量比 (6A) 和摩尔比 (6B) 对速率作图。由实心正方形表示的制剂仅含有蔗糖。含有其它热稳定剂的制剂用空心圆圈描绘。

[0068] 详述

[0069] 虽然与本文中所描述的那些相似或等效的任何方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,但是现在描述优选的方法和材料。

[0070] 生物制药工业中一个新出现的问题是在足够高的浓度下提供稳定的蛋白质制剂以便能够以小体积递送有效剂量。为了帮助维持蛋白质的稳定性,制剂中包含了各种稳定剂和其它赋形剂。这提出了蛋白质稳定性和蛋白质浓度之间的折衷。本发明提供了含有在高密度下保持稳定的蛋白质的改进制剂。每单位体积递送的稳定蛋白质的量增加而不牺牲蛋白质稳定性。

[0071] 一方面,本发明提供了含有约60%-97% (w/w) 的糖蛋白和约3%-40% (w/w) 的热稳定剂的经配制的药物粉末。另一方面,本发明提供了含有约85%-97% (w/w) 的糖蛋白而

不含热稳定剂的经配制的药物粉末。在该方面的一个实施方案中,残留在粉末中的残余水稳定了该蛋白质。

[0072] 在一些实施方案中,经配制的药物粉末含有60-70% (w/w) 糖蛋白、60-70% (w/w) 糖蛋白、65-75% (w/w) 糖蛋白、70-80% (w/w) 糖蛋白、75-85% (w/w) 糖蛋白、80-90% (w/w) 糖蛋白、85-95% (w/w) 糖蛋白、约60% (w/w) 糖蛋白、约62% (w/w) 糖蛋白、约64% (w/w) 糖蛋白、约66% (w/w) 糖蛋白、约68% (w/w) 糖蛋白、约70% (w/w) 糖蛋白、约72% (w/w) 糖蛋白、约74% (w/w) 糖蛋白、约76% (w/w) 糖蛋白、约78% (w/w) 糖蛋白、约80% (w/w) 糖蛋白、约82% (w/w) 糖蛋白、约84% (w/w) 糖蛋白、约86% (w/w) 糖蛋白、约88% (w/w) 糖蛋白、约90% (w/w) 糖蛋白、约92% (w/w) 糖蛋白、约94% (w/w) 糖蛋白、约96% (w/w) 糖蛋白或约98% (w/w) 糖蛋白。

[0073] 在一些实施方案中,经配制的药物粉末含有3-6% (w/w) 热稳定剂、5-7% (w/w) 热稳定剂、6-8% (w/w) 热稳定剂、7-9% (w/w) 热稳定剂、8-10% (w/w) 热稳定剂、9-11% (w/w) 热稳定剂、10-12% (w/w) 热稳定剂、11-13% (w/w) 热稳定剂、12-14% (w/w) 热稳定剂、13-15% (w/w) 热稳定剂、14-16% (w/w) 热稳定剂、15-17% (w/w) 热稳定剂、16-18% (w/w) 热稳定剂、17-19% (w/w) 热稳定剂、18-20% (w/w) 热稳定剂、19-21% (w/w) 热稳定剂、20-22% (w/w) 热稳定剂、21-23% (w/w) 热稳定剂、22-24% (w/w) 热稳定剂、23-25% (w/w) 热稳定剂、24-26% (w/w) 热稳定剂、25-27% (w/w) 热稳定剂、22-24% (w/w) 热稳定剂、23-25% (w/w) 热稳定剂、24-26% (w/w) 热稳定剂、25-27% (w/w) 热稳定剂、22-24% (w/w) 热稳定剂、23-25% (w/w) 热稳定剂、24-26% (w/w) 热稳定剂、25-27% (w/w) 热稳定剂、26-28% (w/w) 热稳定剂、27-29% (w/w) 热稳定剂、28-30% (w/w) 热稳定剂、29-31% (w/w) 热稳定剂、30-32% (w/w) 热稳定剂、31-33% (w/w) 热稳定剂、32-34% (w/w) 热稳定剂、33-35% (w/w) 热稳定剂、34-36% (w/w) 热稳定剂、35-37% (w/w) 热稳定剂、36-38% (w/w) 热稳定剂、37-39% (w/w) 热稳定剂、38-40% (w/w) 热稳定剂或39-41% (w/w) 热稳定剂。

[0074] 在一些实施方案中,本发明的经配制的药物粉末含有一群微米级蛋白质颗粒。粉末-成分微米级蛋白质颗粒在本文中可以被称为“含微粉化蛋白质的颗粒”、“蛋白质颗粒”、“蛋白质微颗粒”、“微颗粒”、“含微粉化蛋白质颗粒群”、“蛋白质颗粒群”、“蛋白质微粒群”、“微粒群”、“粉末-成分蛋白质微粒”或“成分蛋白质微粒”。

[0075] 在一些实施方案中,主题经配制的粉末在常规储存条件下和药物填充操作期间是自由流动的。在一些实施方案中,主题粉末具有的在填充操作条件或储存条件下的豪斯纳比率(Hausner ratio) (即粉末的振实密度与粉末的堆密度之比) 为<1.5、<1.45、<1.4、<1.35、<1.3、<1.25、<1.2、<1.15或<1.1。

[0076] 在一些实施方案中,测定粉末的可流动性的优选方法是通过翻转小瓶测定(tumbling vial assay)进行的。将透明的玻璃小瓶部分地填充经配制的药物粉末,然后小瓶在其垂直轴上旋转。旋转小瓶时能够自由翻转的粉末是可流动的。在一些实施方式中,具有一定的静电荷导致其粘附到小瓶壁或需要轻微的敲击或静电去除以使其在旋转小瓶时翻转的粉末被认为是可流动的。在一些实施方案中,粉末是可流动的,其中在旋转小瓶后<30%、<25%、<20%、<15%、<10%或<5%的小瓶内表面被粉末覆盖。在一些实施方案中,粉末是可流动的,其中当在硬表面上敲击小瓶或用手指敲击小瓶1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次或10次时,旋转后粘附至小瓶壁的成分颗粒从小瓶壁移除。在一些实施方案

中,粉末是可流动的,其中当以 ≤ 25 微牛顿(μN)、约 $25\mu\text{N}$ 、约 $20\mu\text{N}$ 、约 $15\mu\text{N}$ 、约 $10\mu\text{N}$ 、约 $9\mu\text{N}$ 、约 $8\mu\text{N}$ 、约 $7\mu\text{N}$ 、约 $6\mu\text{N}$ 、约 $5\mu\text{N}$ 、约 $4\mu\text{N}$ 、约 $3\mu\text{N}$ 、约 $2\mu\text{N}$ 、约 $1\mu\text{N}$ 或 $<1\mu\text{N}$ 的累积力敲击小瓶时,旋转后粘附至小瓶壁的成分颗粒从小瓶壁移除。在一些实施方案中,其中绝大多数成分颗粒由于静态力粘附至小瓶壁并且不会翻滚的粉末是不可流动的。在一些实施方案中,代表可流动粉末的优选参考粉末由 $50\text{-}150\mu\text{m}$ 玻璃珠(马尔文QA标准品(Malvern QA standard),部件#CRM0016,由Whitehouse Scientific, Chester, UK.生产)组成。

[0077] 在一些实施方式中,粉末流动性通过休止角、可压缩性(例如,豪斯纳比率)、在旋转鼓中流动、流过孔口、剪切单元分析(shear cell analysis)、流变测定或分配速率测量。在一些实施方案中,用REVOLUTION粉末分析仪(REVOLUTION Powder Analyzer, Mercury Scientific Inc., Newtown, CT)、EVOLUTION粉末测试仪(EVOLUTION Powder Tester, Mercury)、VOLUTION粉末流动测试仪(VOLUTION Powder Flow Tester, Mercury)或FT 300流动性测试仪(FT 300Flowability Tester, Sotax AG, Aesch, CH.)测量流动性。Rao等人, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 第74卷, 第2期, 2010年2月, 第388-396页并入本文,以用于通过磁鼓旋转(drum rotation)和雪崩测定流速。

[0078] 在一些实施方案中,通过流动穿过孔口的流量测定可流动性。在其中粉末的量是有限的(例如,1-2克或更少)的一些实施方案中,流动穿过孔口是通过以下步骤进行的:穹形结构的迭代断裂、随后使粉末流动穿过孔口(例如,3mm)并作为时间的函数测量通过孔口的粉末的重量。流速以毫克/秒报告。在一些实施方案中,当通过3mm孔口的流速为 $\geq 10\text{mg/sec}$ 、 $\geq 15\text{mg/sec}$ 、 $\geq 20\text{mg/sec}$ 、 $\geq 25\text{mg/sec}$ 、 $\geq 30\text{mg/sec}$ 、 $\geq 35\text{mg/sec}$ 、 $\geq 40\text{mg/sec}$ 、 $\geq 45\text{mg/sec}$ 、 $\geq 50\text{mg/sec}$ 、 $\geq 55\text{mg/sec}$ 、 $\geq 60\text{mg/sec}$ 、 $\geq 65\text{mg/sec}$ 、 $\geq 70\text{mg/sec}$ 、 $\geq 75\text{mg/sec}$ 、 $\geq 80\text{mg/sec}$ 、 $\geq 85\text{mg/sec}$ 、 $\geq 90\text{mg/sec}$ 、 $\geq 95\text{mg/sec}$ 或 $\geq 100\text{mg/sec}$ 时,经配制的药物粉末是可流动的。Seppälä等人, AAPS PharmSciTech, 第11卷, 第1期, 2010年3月, 第402-408页并入本文用于通过穿过孔口的流速表征药物-赋形剂掺混物可流动性。

[0079] 主题经配制的药物粉末的组分蛋白质微粒可以是大致球形的。一些蛋白质微粒接近球形,而其它蛋白质微粒具有更不规则的形状。蛋白质微粒的形状可以尤其通过静态光散射(DLS)、微流成像(MFI)或激光衍射来确定。DLS依靠测量由强光定向到颗粒混悬液所产生的几个不同角度的散射光强度。然后将Fraunhofer方程应用于散射数据以确定蛋白质微粒的尺寸和形状。US5,104,221A通过引用并入本文,用于Fraunhofer方程的应用以确定微米级颗粒的尺寸和形状。DLS通常应用于1微米或更小的物体。MFI基于从穿过流动池的样品流获得的颗粒的一系列明场图像。分析图像以确定颗粒的尺寸和圆度或纵横比。圆度是指蛋白质微粒是多么圆或球形,并且以0-1的等级表示,其中1是完美球形的。术语“纵横比”通常用物体的宽度来表示长度,与“圆度”可互换使用。纵横比可以表示为短轴长度与长轴长度的比率。因此,更球形的颗粒具有更接近1的“纵横比”(例如,0.98)。

[0080] 激光衍射是另一种基于Fraunhofer衍射的方法,用于测定1-100微米范围内的颗粒形状和尺寸。激光通过颗粒混悬液,并且介入透镜将衍射光聚焦到传感器上。De Boer等人, Int. J. Pharmaceutics, 249 (1-2): 219-231 (2002) 并入本文以用于通过激光衍射进行颗粒尺寸测量。在一个实施方案中,使用Malvern MASTERSIZER 3000激光粒度分析仪(Malvern, UK.)通过激光衍射来测定粉末成分蛋白质微粒的尺寸分布。

[0081] 在一些实施方案中,蛋白质微粒的形状近似球形。在一个实施方案中,蛋白质微粒

的纵横比 ≥ 0.80 。在另一个实施方案中,蛋白质微粒的纵横比为约0.90至约0.98。蛋白质微粒的形状可以尤其通过微流成像(MFI)来确定。

[0082] 如本文所用,粉末组分微粒的术语“直径”包括以下中任一项的含义:(a)围绕微粒的球体的直径,(b)适合微粒或蛋白核边界内的最大球体的直径,(c) (a)的外接球与(b)的受限球之间的任何量度,包括两者之间的平均值,(d)微粒的最长轴的长度,(e)微粒的最短轴的长度,(f)长轴的长度(d)和短轴的长度(e)之间的任何度量,包括两者之间的平均值,和/或(g)如由MFI、光遮蔽方法(诸如DLS)等确定的等效圆直径(“ECD”)。MFI和DLS通常描述于Sharma等人的“Micro-flow imaging:flow microscopy applied to subvisible particulate analysis in protein formulations,”12(3) AAPS J.455-64(2010);和B.J.Frisken,“Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data,”40(24) Applied Optics 4087-91(2001),并入本文以用于微流成像和动态光散射。直径通常以微米(μm 或微米)表示。

[0083] 主题经配制的药物粉末的蛋白质微粒可以是近似球形的形状并且具有2微米至约45微米范围内的直径。在一个实施方案中,如通过MFI测定,粉末的大部分蛋白质微粒具有小于10微米的直径。在一些实施方案中,主题经配制的药物粉末的模式蛋白质微粒尺寸为1-10 μm 、2-10 μm 、3-10 μm 、4-10 μm 、5-10 μm 、6-10 μm 、7-10 μm 、8-10 μm 、9-10 μm 、1-9 μm 、1-8 μm 、1-7 μm 、1-6 μm 、1-5 μm 、1-4 μm 、1-3 μm 、1-2 μm 、2-9 μm 、2-8 μm 、2-7 μm 、2-6 μm 、约1 μm 、约1.5 μm 、约2 μm 、约2.5 μm 、约3 μm 、约3.5 μm 、约4 μm 、约4.5 μm 、约5 μm 、约5.5 μm 、约6 μm 、约6.5 μm 、约7 μm 、约7.5 μm 、约8 μm 、约8.5 μm 、约9 μm 、约9.5 μm 或约10 μm 。

[0084] 在一些实施方案中,蛋白质微粒的直径 $< 50\mu\text{m}$ 。在一个实施方案中,蛋白质微粒的直径 $< 12\mu\text{m}$ 。在另一个实施方案中,蛋白质微粒的直径 $< 10\mu\text{m}$ 。在又一个实施方案中,蛋白质微粒的直径为约0.5 μm 至约7.0 μm 。在一个具体实施方案中,蛋白质微粒的直径为约5.0 μm 。在另一个具体实施方式中,蛋白质微粒的直径为约2.5 μm 。蛋白质微粒的直径可以尤其通过MFI或静态光散射来确定。

[0085] 蛋白质微粒的直径与蛋白质微粒的体积正相关。例如,完美的10微米球体大约为 5×10^{-4} 纳升,并且完美的5微米球体大约为 7×10^{-5} 纳升。在一些实施方案中,主题经配制的药物粉末的模式蛋白质微粒体积为 5×10^{-7} - 5×10^{-4} nL、 10^{-6} - 5×10^{-4} nL、 5×10^{-6} - 5×10^{-4} nL、 10^{-5} - 5×10^{-4} nL、 5×10^{-5} - 5×10^{-4} nL、 10^{-4} - 5×10^{-4} nL、约 5×10^{-7} nL、约 6×10^{-7} nL、约 7×10^{-7} nL、约 8×10^{-7} nL、约 9×10^{-7} nL、约 10^{-6} nL、约 2×10^{-6} nL或约 3×10^{-6} nL、约 4×10^{-6} nL、约 5×10^{-6} nL或约 6×10^{-6} nL、约 7×10^{-6} nL、约 8×10^{-6} nL或约 9×10^{-6} nL、约 10^{-5} nL、约 2×10^{-5} nL或约 3×10^{-5} nL、约 4×10^{-5} nL、约 5×10^{-5} nL或约 6×10^{-5} nL、约 7×10^{-5} nL、约 8×10^{-5} nL或约 9×10^{-5} nL、约 10^{-4} nL、约 2×10^{-4} nL或约 3×10^{-4} nL、约 4×10^{-4} nL、约 5×10^{-4} nL或约 6×10^{-4} nL、约 7×10^{-4} nL、约 8×10^{-4} nL或约 9×10^{-4} nL或 10^{-3} nL。

[0086] 在本发明的一个实施方案中,所提供的经配制的药物粉末是“干透的”。干透的粉末可能含有高达3% (w/w) 的水。在一些实施方案中,干透的粉末含有 $\leq 3\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.9\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.8\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.7\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.6\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.4\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.3\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.2\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.1\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.0\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.9\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.8\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.7\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.6\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.4\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.3\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.2\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.1\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.0\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.9\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.8\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.7\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.6\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.5\%$ (w/w) 水、 \leq

0.4% (w/w) 水、 $\leq 0.3\%$ (w/w) 水、 $\leq 0.2\%$ (w/w) 水或 $\leq 0.1\%$ (w/w) 水。在一些实施方案中,干透的粉末含有约3% (w/w) 水、约2.5% (w/w) 水、约2% (w/w) 水、约1.5% (w/w) 水、约1% (w/w) 水、约0.5% (w/w) 水或约0% (w/w) 水。在一些实施方案中,干透的粉末含有0%-3% (w/w) 水、0.05%-3% (w/w) 水、0.5%-3% (w/w) 水、1%-3% (w/w) 水、2%-3% (w/w) 水、0%-2% (w/w) 水、0.05%-2% (w/w) 水、0.5%-2% (w/w) 水、1%-2% (w/w) 水、0%-1% (w/w) 水、0.05%-1% (w/w) 水或0.5%-1% (w/w) 水。

[0087] 在另一个实施方案中,所提供的经配制的药物粉末不是干透的。在一些实施方案中,所提供的非干透的经配制的药物粉末含有不多于10% (w/w) 的水。在一些实施方案中,所提供的非干透的经配制的药物粉末含有多于3% (w/w) 的水和不多于10% (w/w) 的水、3.5%-10% (w/w) 水、4%-10% (w/w) 水、4.5%-10% (w/w) 水、5%-10% (w/w) 水、5.5%-10% (w/w) 水、6%-10% (w/w) 水、6.5%-10% (w/w) 水、7%-10% (w/w) 水、7.5%-10% (w/w) 水、8%-10% (w/w) 水、8.5%-10% (w/w) 水、9%-10% (w/w) 水、9.5%-10% (w/w) 水、 $>3\%$ -9% (w/w) 水、 $>3\%$ -9% (w/w) 水、 $>3\%$ -8.5% (w/w) 水、 $>3\%$ -8% (w/w) 水、 $>3\%$ -7.5% (w/w) 水、 $>3\%$ -7% (w/w) 水、 $>3\%$ -6.5% (w/w) 水、 $>3\%$ -6% (w/w) 水、 $>3\%$ -5.5% (w/w) 水、 $>3\%$ -5% (w/w) 水、 $>3\%$ -4.5% (w/w) 水、 $>3\%$ -4% (w/w) 水、 $>3\%$ -3.5% (w/w) 水、约3.1% (w/w) 水、约3.5% (w/w) 水、约4% (w/w) 水、约4.5% (w/w) 水、约5% (w/w) 水、约5.5% (w/w) 水、约6% (w/w) 水、约6.5% (w/w) 水、约7% (w/w) 水、约7.5% (w/w) 水、约8% (w/w) 水、约8.5% (w/w) 水、约9% (w/w) 水、约9.5% (w/w) 水或约10% (w/w) 水。

[0088] 在一些实施方案中,所提供的经配制的药物粉末可以含有至多10% (w/w) 的水。在一些实施方案中,粉末含有 $\leq 10\%$ (w/w) 水、 $\leq 9.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 9\%$ (w/w) 水、 $\leq 8.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 8\%$ (w/w) 水、 $\leq 7.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 7\%$ (w/w) 水、 $\leq 6.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 6\%$ (w/w) 水、 $\leq 5.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 5\%$ (w/w) 水、 $\leq 4.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 4\%$ (w/w) 水、 $\leq 3.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 3\%$ (w/w) 水、 $\leq 2.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 2\%$ (w/w) 水、 $\leq 1.5\%$ (w/w) 水、 $\leq 1\%$ (w/w) 水或 $\leq 0.5\%$ (w/w) 水。在一些实施方案中,粉末含有约10% (w/w) 水、约9.5% (w/w) 水、约9% (w/w) 水、约8.5% (w/w) 水、约8% (w/w) 水、约7.5% (w/w) 水、约7% (w/w) 水、约6.5% (w/w) 水、约6% (w/w) 水、约5.5% (w/w) 水、约5% (w/w) 水、约4.5% (w/w) 水、约4% (w/w) 水、约3.5% (w/w) 水、约3% (w/w) 水、约2.5% (w/w) 水、约2% (w/w) 水、约1.5% (w/w) 水、约1% (w/w) 水、约0.5% (w/w) 水或约0% (w/w) 水。在一些实施方案中,粉末含有0.01%-10% (w/w) 水、0.01%-3% (w/w) 水、0.5%-4% (w/w) 水、3%-10% (w/w) 水、0%-3% (w/w) 水、0.5%-3.5% (w/w) 水、1%-4% (w/w) 水、1.5%-4.5% (w/w) 水、2%-5% (w/w) 水、2.5%-5.5% (w/w) 水、3%-6% (w/w) 水、3.5%-6.5% (w/w) 水、4%-7% (w/w) 水、4.5%-7.5% (w/w) 水、5%-8% (w/w) 水、5.5%-8.5% (w/w) 水、6%-9% (w/w) 水、6.5%-9.5% (w/w) 水或7%-10% (w/w) 水。

[0089] 微粒的水含量可以通过本领域已知的任何一种或多种方法来确定。那些方法包括重量分析法,包括热重分析法、气相色谱法、近红外光谱法、库仑法和卡尔费休法 (Karl Fischer method)。这些方法综述于J.K.Townes, "Moisture content in proteins: its effects and measurement," 705 J.Chromatography A 115-127, 1995, 以及其中引用的参考文献。例如,可以使用干燥损失 (LOD) 法 (重量分析法), 其中将微粒称重、经受加热以除去水和其它挥发物, 然后再称重。质量损失归因于起始材料中含有的水 (和其它挥发物)。近红外光谱法测量来自穿过含有蛋白质的玻璃小瓶 (玻璃表面) 的1100nm至2500nm的反射率, 以

确定含水量而不破坏样品。参见美国药典, XXIII修订版, USP Convention, Rockville, MD 1995, 第1801-1802页; 和Savage等人, “Determination of Adequate Moisture Content for Efficient Dry-Heat Viral Inactivation in Lyophilized Factor VIII by Loss on Drying and by Near Infrared Spectroscopy,” 26Biologicals 119-124, 1998。确定水含量的优选方法是卡尔费休法(体积法或库仑法), 其通过测量 I_2 对 SO_2 的氧化来确定 H_2O 的量, 其中每摩尔 H_2O 消耗一摩尔 I_2 。

[0090] 水可以稳定或以其它方式有助于主题经配制的药物粉末的蛋白质的稳定性, 并且在一些实施方案中替代热稳定剂。

[0091] 在一个实施方案中, 经配制的药物粉末中提供的糖蛋白是稳定的。术语“稳定的”或“稳定性”是指在确定的条件下储存后, 或在沉积到生理相关环境中之后, 保留糖蛋白的可接受程度的物理和化学结构或生物学功能。即使蛋白质在储存或沉积达限定量的时间后仍未保持100%的其化学结构或生物学功能, 它仍可能是稳定的。在某些情况下, 储存或沉积达限定量的时间后维持约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%的蛋白质结构或功能可被视为“稳定的”。

[0092] 可以尤其通过确定在限定的温度下储存或沉积达限定量的时间后保留在制剂中的天然分子的百分比测量稳定性。可以尤其通过尺寸排阻色谱(例如, 尺寸排阻高效液相色谱[SE-HPLC])测定保留其天然构象的蛋白质的百分比。为了确定蛋白质的稳定性, 在一个实施方案中, 将主题经配制的药物粉末溶解, 然后对蛋白质进行测试。天然蛋白质包括未聚集且未降解的蛋白质。在一些实施方案中, 在限定的温度下储存达限定量的时间后或在患者(如, 植入)体内沉积后在生理条件下, 至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的天然形式的蛋白质可在提供的经配制的药物粉末中检测到。

[0093] 聚集的蛋白质可以作为在凝胶或色谱筛上作为高分子量物质迁移的物质来检测。术语“高分子量”或“HMW”物质或蛋白质可与“聚集物(aggregate)”、“聚集物(aggregates)”或“聚集蛋白质”互换使用。主题经配制的药物粉末的稳定蛋白质经历HMW物质形成的速率增加(又称聚集速率)为 $<10\%/月^{1/2}$ 、 $<9\%/月^{1/2}$ 、 $<8\%/月^{1/2}$ 、 $<7\%/月^{1/2}$ 、 $<6\%/月^{1/2}$ 、 $<5\%/月^{1/2}$ 、 $<4\%/月^{1/2}$ 、 $<3\%/月^{1/2}$ 、 $<2\%/月^{1/2}$ 或 $<1\%/月^{1/2}$ 。在一个优选的实施方案中, 经配制的药物粉末中提供的蛋白质的聚集速率为 $<5\%/月^{1/2}$ 。

[0094] 测量稳定性后的确定的时间量可以是至少14天、至少28天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月、至少6个月、至少7个月、至少8个月、至少9个月、至少10个月、至少11个月、至少12个月、至少18个月、至少24个月或更多。评估稳定性时可以保持微粒的温度可以是约-80℃至约50℃的任何温度, 例如, 储存在约-80℃、约-30℃、约-20℃、约0℃、约4℃-8℃、约5℃、约25℃或其它环境温度、约35℃、约37℃或其它生理温度、约45℃或约50℃。

[0095] 稳定性可以通过确定在限定的温度下储存达限定量的时间后形成聚集物(即高分子量物质)的蛋白质的百分比来测量, 其中稳定性与形成的高分子量(HMW)物质的百分比成反比。如上所述, 蛋白质的HMW物质的百分比可以在溶解后通过尺寸排阻色谱测定。如果在环境温度下三个月后检测到呈HMW形式的小于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、

1%、0.5%或0.1%的蛋白质,则蛋白质微粒也可被认为是稳定的。优选地,在配制的药物粉末中提供的<10%、<5%或<2%的蛋白质作为HMW物质存在。

[0096] 可以通过测定在限定的温度下在限定量的时间之后在微粒内被降解或以其它方式被发现为低分子量(LMW)物质的蛋白质的百分比来测量稳定性,其中稳定性与在溶解的微粒中检测到的LMW物质的百分比成反比。如上所述,蛋白质的LMW物质的百分比可以通过尺寸排阻色谱来测定。如果在环境温度下三个月后小于约25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%的第一个分子以LMW形式检测到,则还可将蛋白质微粒视为稳定的。

[0097] 在一些实施方案中,主题经配制的药物粉末含有缓冲剂。缓冲剂在本领域是众所周知的。通常,用于制备主题粉末的水性蛋白质溶液原料中包含缓冲剂。在一些实施方案中,缓冲剂以1mM至100mM的浓度包含在原料中。在一些具体的实施方案中,缓冲液以约10mM包含在原料中。在某些实施方案中,缓冲剂以5mM±0.75mM至15mM±2.25mM;6mM±0.9mM至14mM±2.1mM;7mM±1.05mM至13mM±1.95mM;8mM±1.2mM至12mM±1.8mM;9mM±1.35mM至11mM±1.65mM;10mM±1.5mM;或约10mM的浓度存在于原料中。在一些实施方案中,原料的缓冲系统包含10mM±1.5mM的组氨酸、磷酸盐和/或乙酸盐。

[0098] 在一些实施方案中,缓冲剂以≤10% (w/w)、≤9.5% (w/w)、≤9% (w/w)、≤8.5% (w/w)、≤8% (w/w)、≤7.5% (w/w)、≤7% (w/w)、≤6.5% (w/w)、≤6% (w/w)、≤5.5% (w/w)、≤5% (w/w)、≤4.5% (w/w)、≤4% (w/w)、≤3.5% (w/w)、≤3% (w/w)、≤2.5% (w/w)、≤2% (w/w)、≤1.5% (w/w)、≤1% (w/w)或≤0.5% (w/w)的浓度存在于主题经配制的药物粉末中。在一些实施方案中,缓冲剂以0.1-0.5% (w/w)、0.5-1% (w/w)、0.5-1.5% (w/w)、1-2% (w/w)、1.5-2.5% (w/w)、2-3% (w/w)、2.5-3.5% (w/w)、3-4% (w/w)、3.5-4.5% (w/w)、4-5% (w/w)、4.5-5.5% (w/w)、5-6% (w/w)、5.5-6.5% (w/w)、6-7% (w/w)、6.5-7.5% (w/w)、8-9% (w/w)、8.5-9.5% (w/w)或9-10% (w/w)的浓度存在于主题经配制的药物粉末中。

[0099] 在一些实施方案中,缓冲剂选自包含端值地涵盖在约3至约9的pH范围内或约3.7至约8.0的pH范围内的缓冲剂。例如,含蛋白质的水溶液原料可具有约3.4、约3.6、约3.8、约4.0、约4.2、约4.4、约4.6、约4.8、约5.0、约5.2、约5.4、约5.6、约5.8、约6.0、约6.2、约6.4、约6.6、约6.8、约7.0、约7.2、约7.4、约7.6、约7.8或约8.0的pH。

[0100] 缓冲剂可以是各个缓冲剂的组合,诸如如,组氨酸和乙酸盐(his-乙酸盐缓冲剂)的组合。在一个实施方案中,缓冲剂具有约3.5至约6、或约3.7至约5.6的缓冲范围,诸如由乙酸盐缓冲的范围。在一个实施方案中,缓冲剂具有约5.5至约8.5、或约5.8至约8.0的缓冲范围,诸如由磷酸盐缓冲的范围。在一个实施方案中,缓冲剂具有约5.0至约8.0、或约5.5至约7.4的缓冲范围,诸如由组氨酸缓冲的范围。

[0101] 在一个实施方案中,主题经配制的药物不含额外的缓冲剂。在此,通过所包含的蛋白质、热稳定剂(如果存在的话)或水提供粉末或液体水性原料的任何缓冲能力。

[0102] 表面活性剂(一种或多种)也可以包含在含微粒蛋白前体的水性原料中。如本文所用,术语“表面活性剂”意指降低其溶解于其中的流体的表面张力和/或降低油与水之间的界面张力的物质。表面活性剂可以是离子型或非离子型。可包含在原料(以及随后经配制的药物粉末)中的示例性非离子型表面活性剂包括例如烷基聚(环氧乙烷)、烷基多葡萄糖苷(如

辛基葡糖苷和癸基麦芽糖苷)、脂肪醇诸如十六烷基醇和油基醇、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA和椰油酰胺TEA。可包含在原料中的特定非离子表面活性剂包括如聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯(又名聚山梨醇酯),诸如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯28、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯81和聚山梨醇酯85;泊洛沙姆,诸如泊洛沙姆188、泊洛沙姆407;聚乙二醇-聚丙二醇;或聚乙二醇(PEG)。聚山梨醇酯20也被称为TWEEN 20、脱水山梨糖醇单月桂酸酯和聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯。

[0103] 包含在原料溶液内的表面活性剂的量可以根据粉末所需的特定性质和目的而变化。可以通过调节表面活性剂含量来影响粉末的整体性质诸如流动性。虽然不希望受理论束缚,但表面活性剂通过降低表面张力影响水性蛋白质液滴(主题粉末的前体)的空气-表面界面。更高浓度的表面活性剂产生更圆润的和更平滑的蛋白质微粒,这可以提高可流动性。更低浓度的表面活性剂产生更不圆且更微凹的蛋白质微粒。

[0104] 在某些实施方案中,含有主题蛋白质的前体水溶液可含有约0.015% (w/v) 至约0.1% (w/v) 的表面活性剂(如,聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)。例如,原料可以含有约0.015%;约0.016%;约0.017%;约0.018%;约0.019%;约0.02%;约0.021%;约0.022%;约0.023%;约0.024%;约0.025%;约0.026%;约0.027%;约0.028%;约0.029%;约0.03%;约0.031%;约0.032%;约0.033%;约0.034%;约0.035%;约0.036%;约0.037%;约0.038%;约0.039%;约0.04%;约0.041%;约0.042%;约0.043%;约0.044%;约0.045%;约0.046%;约0.047%;约0.048%;约0.049%;约0.05%;约0.051%;约0.052%;约0.053%;约0.054%;约0.055%;约0.056%;约0.057%;约0.058%;约0.059%;约0.06%;约0.061%;约0.062%;约0.063%;约0.064%;约0.065%;约0.066%;约0.067%;约0.068%;约0.069%;约0.07%;约0.071%;约0.072%;约0.073%;约0.074%;约0.075%;约0.076%;约0.077%;约0.078%;约0.079%;约0.08%;约0.081%;约0.082%;约0.083%;约0.084%;约0.085%;约0.086%;约0.087%;约0.088%;约0.089%;约0.09%;约0.091%;约0.092%;约0.093%;约0.094%;约0.095%;约0.096%;约0.097%;约0.098%;约0.099%;或约0.10%的表面活性剂(如聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80)。

[0105] 在一个实施方案中,经配制的药物粉末包含两亲性非离子表面活性剂,诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇的脂肪酸酯。在一个实施方案中,表面活性剂是聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,主题经配制的药物粉末中聚山梨醇酯与蛋白质的重量比为0.003:1-1:5、0.03:10、0.3:50、0.3:25、1:50、0.3:10、3:50、3:25或1:5。

[0106] 可将热稳定剂包含在经配制的药物粉末中(并因此任何前体水溶液以抑制或减少在热应激期间聚集物和其它降解产物的形成。热稳定剂可以是氨基酸,优选具有疏水性侧链的氨基酸,碳水化合物,糖醇,聚合物,共聚物和嵌段共聚物,多肽,表面活性剂等。有用的热稳定剂的实例包括普朗尼克F68、精氨酸、赖氨酸、具有疏水性侧链的那些氨基酸(包括甘氨酸、脯氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)、山梨糖醇、甘露糖醇、甘油、海藻糖、右旋糖、蔗糖和其它碳水化合物、各种环糊精、氯化钠以及其组合。参见Goldberg等人,“Formulation development of therapeutic monoclonal antibodies using high-throughput fluorescence and static light scattering techniques:role of conformational and colloidal stability,”100(4) J.Pharm.Sci.1306-1315,2011,和Bhambhani等人,“Formulation design and high-throughput excipient selection based on

structural integrity and conformational stability of dilute and highly concentrated IgG1 monoclonal antibody solutions,”101(3) J.Pharm.Sci.1120-1135, 2012.

[0107] 碳水化合物可以是还原糖或非还原糖。“还原糖”包括,例如,具有酮或醛基团的糖,并且含有反应性半缩醛基团,其允许糖起到还原剂的作用。还原糖的具体实例包括果糖、葡萄糖、甘油醛、乳糖、阿拉伯糖、甘露糖、木糖、核糖、鼠李糖、半乳糖和麦芽糖。非还原糖可以包含作为缩醛且基本上不与氨基酸或多肽反应以引发美拉德反应(Maillard reaction)的异头碳。非还原糖的具体实例包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、三氯蔗糖、松三糖和棉子糖。糖酸包括例如糖质酸、葡糖酸盐和其它多羟基糖及其盐。

[0108] 在一些实施方案中,热稳定剂以与蛋白质的一定质量-与-质量比或摩尔-与-摩尔比包括在内。虽然不希望受理论束缚,但是据信热稳定剂部分地被认为替代了包围蛋白质的水以帮助保持蛋白质稳定性(水替代疗法),从而允许在维持蛋白质结构的同时去除水。根据本发明的一个方面,将蛋白质与稳定剂的比率最大化,以允许每单位体积配制更高量的蛋白质,同时维持适当的蛋白质结构。在一个实施方案中,对于每5个重量份的蛋白质,经配制的药物粉末含有 ≤ 2 个重量份的热稳定剂。例如,如果预制颗粒原料水溶液含有5mg/ml的蛋白质,则热稳定剂的总量将被以 ≤ 2 mg/ml包含以维持在主题经配制的药物粉末中的5份蛋白质与 ≤ 2 份热稳定剂的比率。在一个实施方案中,对于每5个重量份的蛋白质,经配制的药物粉末含有 ≤ 1 个重量份的热稳定剂。例如,如果原料水溶液含有5mg/ml的蛋白质,则热稳定剂的总量降被以 ≤ 1 mg/ml包含以维持在主题经配制的药物粉末中的5个重量份蛋白质与1个重量份热稳定剂的比率。在一些实施方案中,蛋白质与热稳定剂的重量与重量比为5:2-100:1、5:2-10:3、20:7-4:1、10:3-5:1、4:1-20:3、5:1-10:1、20:3-20:1、10:1-40:1、20:1-50:1或40:1-100:1。

[0109] 在另一个实施方案中,对于每摩尔蛋白质,经配制的药物粉末含有 < 300 摩尔的热稳定剂。例如,如果前体水溶液原料含有1mM蛋白质,则热稳定剂的总量将被以 < 300 mM包含以维持在主题经配制的药物粉末中的 $< 300:1$ 的热稳定剂与蛋白质的摩尔比。在一些实施方案中,热稳定剂与蛋白质的摩尔比为350:1-1:1、350:1-300:1、325:1-275:1、300:1-250:1、275:1-225:1、250:1-200:1、225:1-175:1、200:1-150:1、175:1-125:1、150:1-100:1、125:1-75:1、100:1-50:1、75:1-25:1或50:1- $\leq 1:1$ 。

[0110] 热稳定剂组分可以含有多于一种的分子物质。例如,热稳定剂可以由以下中的任一种或多种组成:蔗糖、海藻糖、甘露糖醇、精氨酸(Arg)和疏水性氨基酸甘氨酸(Gly)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、甲硫氨酸(Met)和色氨酸(Trp),其各种相对量总计达热稳定剂的总累积量。表1和2提供了在特定的水性原料溶液中热稳定剂与蛋白质的有用比率的实例,并且表4提供了在具体经配制的药物粉末中热稳定剂与蛋白质的有用比率的实例以及源自表3的那些原料制剂的粉末中蛋白质的稳定性。

[0111] 在一些实施方案中,主题热稳定剂可以是高分子(> 200 克/摩尔)。可用作热稳定剂的大分子包括二糖,诸如蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖、纤维二糖等。蔗糖和海藻糖是优选的大分子稳定剂。

[0112] 表1:具有热稳定剂的药物粉末原料

[0113]

范例	蛋 白 质 (mg/ml)	热稳定剂(mg/ml)			
		蔗糖	海藻糖	甘露糖醇	异亮氨酸
1	50	10	-	-	-
2	50	20	-	-	-
3	50	10	-	5	5
4	50	-	10	-	-
5	50	-	20	-	-
6	50	-	10	5	5
7	50	-	-	10	10
8	50	-	-	-	-
9	50	-	10	-	-
10	50	-	20	-	-
11	50	-	10	-	-
12	5	1	-	-	-
13	5	2	-	-	-

[0114]

范例	蛋 白 质 (mg/ml)	热稳定剂(mg/ml)			
		蔗糖	海藻糖	甘露糖醇	异亮氨酸
14	5	1	-	0.5	0.5
15	5	-	1	-	-
16	5	-	2	-	-
17	5	-	1	0.5	0.5
18	5	-	-	1	1

[0115] 表2:具有热稳定剂、缓冲剂和表面活性剂的药物粉末原料

[0116]

制剂	蛋白质 (mg/mL)	磷酸盐 (mM)	热稳定剂				聚山梨 醇酯 20(% w/v)
			蔗糖 (% w/v)	海藻糖 (% w/v)	甘露醇 (% w/v)	异亮氨酸 (% w/v)	
19	50	10	2				0.015
20	50	10	1				0.015
21	50	10	1		0.5	0.5	0.015
22	50	10		2			0.015
23	50	10		1	0.5	0.5	0.015
24	50	10			1	1	0.015
25	50	10	2				0.03
26	50	10	1				0.03
27	50	10	1		0.5	0.5	0.03
28	50	10		2			0.03
29	50	10		1	0.5	0.5	0.03
30	50	10			1	1	0.03
31	50	10	2				0.06

[0117]

制剂	蛋白质 (mg/mL)	磷酸盐 (mM)	热稳定剂				聚山梨 醇酯 20(% w/v)
			蔗糖 (% w/v)	海藻糖 (% w/v)	甘露醇 (% w/v)	异亮氨酸 (% w/v)	
32	50	10	1				0.06
33	50	10	1		0.5	0.5	0.06
34	50	10		2			0.06
35	50	10		1	0.5	0.5	0.06
36	50	10			1	1	0.06
37	50	10	2				0.1
38	50	10	1				0.1
39	50	10	1		0.5	0.5	0.1
40	50	10		2			0.1
41	50	10		1	0.5	0.5	0.1
42	50	10			1	1	0.1
43	5	1	0.2				0.015
44	5	1	0.1				0.015
45	5	1	0.1		0.05	0.05	0.015
46	5	1		0.2			0.015
47	5	1		0.1	0.05	0.05	0.015
48	5	1			0.1	0.1	0.015
49	5	1	0.2				0.03
50	5	1	0.1				0.03
51	5	1	0.1		0.05	0.05	0.03
52	5	1		0.2			0.03
53	5	1		0.1	0.05	0.05	0.03

[0118]

制剂	蛋白质 (mg/mL)	磷酸盐 (mM)	热稳定剂				聚山梨醇酯 20(% w/v)
			蔗糖 (% w/v)	海藻糖 (% w/v)	甘露醇 (% w/v)	异亮氨酸 (% w/v)	
54	5	1			0.1	0.1	0.03
55	5	1	0.2				0.06
56	5	1	0.1				0.06
57	5	1	0.1		0.05	0.05	0.06
58	5	1		0.2			0.06
59	5	1		0.1	0.05	0.05	0.06
60	5	1			0.1	0.1	0.06
61	5	1	0.2				0.1
62	5	1	0.1				0.1
63	5	1	0.1		0.05	0.05	0.1
64	5	1		0.2			0.1
65	5	1		0.1	0.05	0.05	0.1
66	5	1			0.1	0.1	0.1

[0119] 表3:具有热稳定剂、缓冲剂和表面活性剂的药物粉末原料

[0120]

范例	液体原料组分(mg/mL)							
	蛋白质	蔗糖	海藻糖	甘露醇	异亮氨酸	脯氨酸	磷酸盐	聚山梨醇酯
67	50	0	0	0	0	0	1.5	0
68	5	0.5	0.25	0	0.25	0	0.15	0.15
69	5	0.5	0	0.25	0.25	0	0.15	0.15
70	5	0	0.5	0.25	0.25	0	0.15	0.15

[0121]

71	5	0.5	0	0	0.5	0	0.15	0.15
72	5	0.5	0	0	0	0.5	0.15	0.15
73	5	0.5	0	0.5	0	0	0.15	0.15
74	5	1	0	0	0	0	0.15	0.15
75	5	2	0	0	0	0	0.15	0.2
76	5	2	0	0	0	0	0.15	0
77	5	0	2	0	0	0	0.15	0
78	5	0	1	0.5	0.5	0	0.15	0
79	50	5	0	0	0	0	1.5	0
80	50	10	0	0	0	0	1.5	0
81	50	5	0	2.5	2.5	0	1.5	0
82	50	20	0	0	0	0	1.5	0
83	50.6	9	0	4.5	4.5	0	1.35	0
84	50	10	0	10	0	0	1.5	0
85	50	10	0	0	10	0	1.5	0
86	50	10	0	5	5	0	1.5	0
87	50	0	0	10	10	0	1.5	0
88	50	0	0	20	0	0	1.5	0
89	50	0	0	0	20	0	1.5	0

[0122] 表4: 药物粉末组分比率和聚集速率

[0123]

范例	粉末中的% w/w 糖蛋白	热稳定剂/糖蛋 白重量比	热稳定剂/糖蛋 白摩尔比	在 50°C 下的 聚 集 速 率 (%HMW/ 月 ^{-1/2})
67	97.5	0.0	0	20.0
68	82.0	0.2	93	10.3
69	82.0	0.2	109	9.4

[0124]

范例	粉末中的% w/w 糖蛋白	热稳定剂/糖蛋白重量比	热稳定剂/糖蛋白摩尔比	在 50°C 下的聚集速率 (%HMW/月 ^{-1/2})
70	82.0	0.2	106	9.5
71	82.0	0.2	121	8.6
72	82.0	0.2	133	8.4
73	82.0	0.2	97	9.3
74	82.0	0.2	67	11.8
75	71.6	0.4	134	7.6
76	73.4	0.4	134	8.2
77	73.4	0.4	122	8.5
78	73.4	0.4	212	5.7
79	90.1	0.1	34	14.8
80	83.8	0.2	67	12.5
81	83.8	0.2	109	12.2
82	73.4	0.4	134	8.2
83	75.6	0.4	194	7.5
84	73.4	0.4	193	6.2
85	73.4	0.4	243	6.0
86	73.4	0.4	218	5.4
87	73.4	0.4	302	4.9
88	73.4	0.4	253	6.8
89	73.4	0.4	351	7.8

[0125] 在一些实施方案中,主题热稳定剂包含一种或多种小分子(≤ 200 克/摩尔)而不含大分子稳定剂。对于给定的重量比,包含低分子量热稳定剂可使摩尔基础上的热稳定剂与蛋白质的比率最大化,从而提供稳定性的益处。可用作热稳定剂的小分子包括单糖(诸如核糖、脱氧核糖、葡萄糖、果糖、半乳糖等)、糖醇和其它多元醇(诸如赤藓糖醇、甘油、苏糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、半乳糖醇、岩藻糖醇、艾杜糖醇、肌醇等)以及氨基酸(诸如精氨酸和疏水性氨基酸甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨

酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸等)。疏水性氨基酸具有有非常小的偶极矩和羧酸(极性)头的脂肪族侧链。因此游离疏水性氨基酸是两亲性的。虽然不希望受到理论的束缚,但两亲性热稳定剂可以为蛋白提供一定程度的保护以防止气液界面变性。优选的小分子热稳定剂包含甘露糖醇、异亮氨酸和脯氨酸。

[0126] 在一些实施方案中,热稳定剂仅包含蔗糖、仅包含海藻糖、仅包含异亮氨酸、仅包含甘露糖醇或仅包含脯氨酸。在一些实施方案中,热稳定剂包含蔗糖和海藻糖的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为3:1-1:3、约2:1、约4:3、约1:1、约3:4或约1:2的蔗糖和海藻糖的组合。

[0127] 在一些实施方案中,热稳定剂包含蔗糖、甘露糖醇和异亮氨酸的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为4:3:1、2:1:1、4:1:3、2:3:1、1:1:1或2:1:3的蔗糖、甘露糖醇和异亮氨酸的组合。

[0128] 在一些实施方案中,与使用甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸或其组合的那些相比具有蔗糖的经配制的药物粉末仅具有更高的聚集速率(图6)。

[0129] 在一些实施方案中,热稳定剂包含海藻糖、甘露糖醇和异亮氨酸的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为4:3:1、2:1:1、4:1:3、2:3:1、1:1:1或2:1:3的海藻糖、甘露糖醇和异亮氨酸的组合。

[0130] 在一些实施方案中,热稳定剂包含蔗糖和异亮氨酸的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为3:1-1:3、约2:1、约4:3、约1:1、约3:4或约1:2的蔗糖和海藻糖的组合。

[0131] 在一些实施方案中,热稳定剂包含蔗糖和脯氨酸的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为3:1-1:3、约2:1、约4:3、约1:1、约3:4或约1:2的蔗糖和脯氨酸的组合。

[0132] 在一些实施方案中,热稳定剂包含蔗糖和甘露糖醇的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为3:1-1:3、约2:1、约4:3、约1:1、约3:4或约1:2的蔗糖和甘露糖醇的组合。

[0133] 在一些实施方案中,热稳定剂包含甘露糖醇和异亮氨酸的组合。在一些实施方案中,热稳定剂包含重量比为3:1-1:3、约2:1、约4:3、约1:1、约3:4或约1:2的甘露糖醇和异亮氨酸的组合。

[0134] 在一个实施方案中,热稳定剂是以与提供的经配制的药物粉末中的蛋白质重量比为约1:5至2:5存在的蔗糖。在另一个实施方案中,经配制的药物粉末包含重量比为约2:1:1:10的蔗糖、甘露糖醇、异亮氨酸和蛋白质。

[0135] 在一个实施方案中,热稳定剂是以与提供的经配制的药物粉末中的蛋白质的重量比为约1:5至2:5存在的海藻糖。在另一个实施方案中,经配制的药物粉末包含重量比为约2:1:1:10的海藻糖、甘露糖醇、异亮氨酸和蛋白质。

[0136] 在一个实施方案中,经配制的药物粉末包含约71-75% (w/w) 糖蛋白、14-15% (w/w) 甘露糖醇、14-15% (w/w) 异亮氨酸或脯氨酸、2-2.5% (w/w) 缓冲剂和3-8% (w/w) 水。

[0137] 在一些实施方案中,经配制的药物粉末由含有主题蛋白质和其它赋形剂的水溶液产生。该前体水溶液也被称为“原料”。在一些实施方案中,原料可以根据重量-与-体积(w/v)基础含有约0.005%至约5%的热稳定剂;约0.01%至约4%的热稳定剂;约.02%至约3%的热稳定剂;或约0.05%至约2%的热稳定剂。在一些实施方案中,本发明的经配制的药物粉末可以包含(w/v)约0.01%;0.02%;0.03%;0.04%;0.05%;0.06%;0.07%;0.08%;

0.09%;0.10%;0.11%;0.12%;0.13%;0.14%;0.15%;0.16%;0.17%;0.18%;0.19%;
0.20%;0.21%;0.22%;0.23%;0.24%;0.25%;0.26%;0.27%;0.28%;0.29%;0.30%;
0.31%;0.32%;0.33%;0.34%;0.35%;0.36%;0.37%;0.38%;0.39%;0.40%;0.41%;
0.42%;0.43%;0.44%;0.45%;0.46%;0.47%;0.48%;0.49%;0.50%;0.51%;0.52%;
0.53%;0.54%;0.55%;0.56%;0.57%;0.58%;0.59%;0.60%;0.61%;0.62%;0.63%;
0.64%;0.65%;0.66%;0.67%;0.68%;0.69%;0.70%;0.71%;0.72%;0.73%;0.74%;
0.75%;0.76%;0.77%;0.78%;0.79%;0.80%;0.81%;0.82%;0.83%;0.84%;0.85%;
0.86%;0.87%;0.88%;0.89%;0.90%;0.91%;0.92%;0.93%;0.94%;0.95%;0.96%;
0.97%;0.98%;0.99%;1.0%;1.1%;1.2%;1.3%;1.4%;1.5%;1.6%;1.7%;1.8%;
1.9%;2.0%;2.1%;2.2%;2.3%;2.4%;2.5%;2.6%;2.7%;2.8%;2.9%;3.0%;
3.1%;3.2%;3.3%;3.4%;3.5%;3.6%;3.7%;3.8%;3.9%;4.0%;4.1%;4.2%;
4.3%;4.4%;4.5%;4.6%;4.7%;4.8%;4.9%;或约5.0%的热稳定剂。

[0138] 在粉末中不存在热稳定剂的本发明的一个方面中,残余水用于稳定蛋白质。

[0139] 在主题经配制的药物粉末中提供的蛋白质不限于任何特定的蛋白质实体。如本文所用,“蛋白质”包括治疗性蛋白质、用于研究或疗法中的重组蛋白、捕获剂蛋白和其它受体 Fc-融合蛋白、嵌合蛋白、抗体、单克隆抗体、人抗体、双特异性抗体、抗体片段、纳米抗体、重组抗体嵌合体、细胞因子、趋化因子、肽激素等。可以使用基于重组细胞的产生系统诸如昆虫杆状病毒系统、酵母系统(例如毕赤酵母属某种(*Pichia* sp.))、哺乳动物系统(如CHO细胞和CHO衍生物如CHO-K1细胞)产生蛋白质。Ghaderi等人,“Production platforms for biotherapeutic glycoproteins:Occurrence,impact,and challenges of non-human sialylation,”28 *Biotechnol Genet Eng Rev.*147-75(2012)通过引用并入本文以用于治疗性蛋白质及其产生。

[0140] 在一些实施方案中,蛋白质是治疗性蛋白质。治疗性蛋白质可以是抗原结合蛋白质,诸如如,可溶性受体片段,抗体(包括IgG)和抗体的衍生物或片段,其它含Fc的蛋白质,包括Fc融合蛋白质,和受体-Fc融合蛋白质,包括捕获剂型蛋白质诸如如阿柏西普(一种VEGF捕获剂分子)、利纳西普(一种IL1-捕获剂分子)和依那西普(一种TNF-捕获剂分子)。Huang,C.,*Curr.Opin.Biotechnol.*20:692-99(2009)并入本文以用于捕获剂型分子。美国专利No.7,303,746 B2、7,303,747 B2和7,374,758 B2并入本文用于阿柏西普。美国专利No.6,927,044 B2并入本文用于利纳西普。美国专利No.8,063,182B2并入本文用于依那西普。

[0141] 术语“蛋白质”包括具有多于约50个经由酰胺键共价连接的氨基酸的任何氨基酸聚合物。蛋白质含有一条或多条氨基酸聚合物链(在本领域通常称为“多肽”)。蛋白质可含有一种或多种多肽以形成单一功能性生物分子。“多肽”通常含有超过50个氨基酸,而“肽”通常含有50个氨基酸或更少。

[0142] 蛋白质可能含有各种共价和非共价修饰。二硫桥(即,在半胱氨酸残基之间以形成胱氨酸)可能存在于一些蛋白质中。这些共价连接可以在单条多肽链内,或在两条单独的多肽链之间。例如,二硫桥对于胰岛素、免疫球蛋白、鱼精蛋白等的适当结构和功能是必不可少的。关于二硫键形成的最近综述,参见Oka和Bulleid,“Forming disulfides in the endoplasmic reticulum,”1833(11)*Biochim Biophys Acta* 2425-9(2013)。

[0143] 除了二硫键形成之外,蛋白质还可能经历其它翻译后修饰。那些修饰包括脂化(如,肉豆蔻酰化、棕榈酰化、法尼烯基化、香叶基香叶酰化和糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定形成)、烷基化(例如甲基化)、酰化、酰胺化、糖基化(例如将糖基基团添加至精氨酸、天冬酰胺、半胱氨酸、羟赖氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和/或色氨酸)和磷酸化(即将磷酸根基团添加到丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和/或组氨酸)。关于真核生物中产生的蛋白质的翻译后修饰的最新综述,参见Mowen和David,“Unconventional post-translational modifications in immunological signaling,”15(6) Nat Immunol 512-20(2014);以及Blixt和Westerlind,“Arraying the post-translational glycoproteome (PTG),”18Curr Opin Chem Biol.62-9(2014)。

[0144] 在一个实施方案中,经配制的药物粉末中提供的蛋白质是糖蛋白,其涵盖具有糖基基团的任何蛋白质。抗体和受体-Fc-融合蛋白(又名捕获剂蛋白或捕获剂分子)是糖蛋白的实例。在异源哺乳动物系统中产生的抗体也在各种残基处(例如在天冬酰胺残基处)与各种多糖发生糖基化,并且可能因物种不同而不同,这可能影响治疗性抗体的抗原性(参见Butler和Spearman,“The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering”,30Curr Opin Biotech 107-112(2014))。IgG分子的N-聚糖通常包括甘露糖基化的N-乙酰葡萄糖胺,其在某些情况下可以包含额外的半乳糖和/或岩藻糖基团。抗体通常具有约150-170kD(kg/mol)的质量,其中糖基化提供约2-3%的质量。参见Plomp等人,“Recent Advances in Clinical Glycoproteomics of Immunoglobulins (Igs),”Mol Cell Proteomics.2016年7月;15(7):2217-28。

[0145] 因为捕获剂分子含有免疫球蛋白Fc结构域,所以它们类似地被N-糖基化。捕获剂分子具有更大的分子量范围,从约50kD(对于依替西普)、约100kD(对于阿柏西普)至约250kD(对于利纳西普)。鉴于阿柏西普多肽链较小的尺寸,糖基化对阿柏西普分子质量的贡献相对水平高于抗体,即约占总质量的5%-16%或更多。虽然不希望受理论束缚,但不同蛋白质的相对糖基化差异可影响主题经配制的药物粉末中热稳定剂与蛋白质的最佳比率。

[0146] 例如,在其中蛋白质是阿柏西普的一个具体实施方案中,主题经配制的药物颗粒包含约62重量%多肽、约12重量%聚糖、约25重量%蔗糖和约2重量%磷酸盐。在其中蛋白质是阿柏西普的另一具体实施方案中,主题经配制的药物颗粒包含约71重量%多肽、约13重量%聚糖、约2重量%磷酸盐和约14.1重量%蔗糖。

[0147] 例如,在其中蛋白质是IgG1分子的具体实施方案中,主题经配制的药物颗粒包含约81重量%蛋白质、约1.5重量%组氨酸、约16重量%蔗糖和约0.2重量%聚山梨醇酯80。

[0148] 例如,在其中蛋白质是IgG4分子的具体实施方案中,主题经配制的药物颗粒包含约45重量%蛋白质、约0.4重量%乙酸盐、约56重量%蔗糖和约0.4重量%聚山梨醇酯20。

[0149] 免疫球蛋白(又称“抗体”)是具有多条多肽链和广泛的翻译后修饰的蛋白质的实例。经典免疫球蛋白蛋白质(如,IgG)包含四条多肽链-两条轻链和两条重链。每条轻链经由胱氨酸二硫键连接至一条重链,并且两条重链经由两个胱氨酸二硫键相互连接。在哺乳动物系统中产生的免疫球蛋白在各种残基处(如,在天冬酰胺残基处)也用各种多糖进行糖基化,并且可能因物种不同而不同,这可能影响治疗性抗体的抗原性。Butler和Spearman,“The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering”,30Curr Opin Biotech 107-112(2014)通过引用哺乳动物细胞系统中糖蛋

白的异源产生并入本文。

[0150] 抗体经常用作治疗性生物分子。如本文所用,术语“抗体”包括由通过二硫键相互连接的四条多肽链,两条重链(H)和两条轻链(L)组成免疫球蛋白分子。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH和VL区可进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其间散布着称为框架区(FR)的更保守区域。每条VH和VL由三个CDR和四个FR组成,其从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(重链CDR可缩写为HCDR1、HCDR2和HCDR3;轻链CDR可缩写为LCDR1、LCDR2和LCDR3)。术语“高亲和力”抗体是指对其靶标具有至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M;至少 10^{-11} M;或至少 10^{-12} M结合亲和力的那些抗体,如通过表面等离子体共振(例如,BIACORE™或溶液亲和力ELISA)测量。

[0151] 短语“双特异性抗体”包括能够选择性结合两个或更多个表位的抗体。双特异性抗体通常包含两条不同的重链,其每条重链特异性结合-两个不同分子上(如,抗原)或同一分子上(如,在相同的抗原上)的不同表位。如果双特异性抗体能够选择性结合两个不同表位(第一表位和第二表位),则第一重链对第一表位的亲和力通常将比第一重链对第二表位的亲和力低至少一个至两个或三个或四个数量级,并且反之亦然。由双特异性抗体识别的表位可以在相同或不同的靶标上(例如,在相同或不同的蛋白质上)。双特异性抗体可以例如通过组合识别相同抗原的不同表位的重链来制备。例如,编码识别相同抗原的不同表位的重链可变序列的核酸序列可以与编码不同重链恒定区的核酸序列融合,并且这样的序列可以在表达免疫球蛋白轻链的细胞中表达。典型的双特异性抗体具有两条重链(每条重链具有三个重链CDR,接着是(N-末端至C-末端)CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域)以及免疫球蛋白轻链(其不赋予抗原结合特异性但可以与每条重链缔合,或者可以与每条重链缔合并且可以结合由重链抗原结合区结合的一个或多个表位,或者可以与每种重链缔合链并使得能够将重链中的一个或两个与一个或两个表位结合)。

[0152] 短语“重链”或“免疫球蛋白重链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白重链恒定区序列,并且除非另有指明否则包括重链可变结构域。除非另有指明,否则重链可变结构域包括三个重链CDR和四个FR区。重链的片段包括CDR、CDR和FR及其组合。典型的重链具有在可变结构域(N-末端至C-末端)之后的CH1结构域、铰链、CH2结构域和CH3结构域。重链的功能片段包括能够特异性识别抗原(如,以微摩尔、纳摩尔或皮摩尔范围的KD识别抗原)的片段,其能够自细胞表达并分泌且包含至少一个CDR。

[0153] 短语“轻链”包括来自任何生物体的免疫球蛋白轻链恒定区序列,并且除非另作说明否则包括人类 κ 和 λ 轻链。除非另作说明,否则轻链可变(VL)结构域通常包括三个轻链CDR和四个框架(FR)区。通常,全长轻链从氨基末端到羧基末端包括包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的VL结构域和轻链恒定结构域。可以与本发明一起使用的轻链包括例如,不选择性结合由抗原结合蛋白选择性结合的第一或第二抗原的那些轻链。适合的轻链包括可以通过筛选现有抗体文库(湿文库或计算机模拟)中最常用的轻链来鉴定的那些轻链,其中轻链基本上不干扰抗原结合蛋白的抗原结合结构域的亲和力和/或选择性。适合的轻链包括可结合被抗原结合蛋白的抗原结合区结合的一个或两个表位的那些轻链。

[0154] 短语“可变结构域”包括免疫球蛋白轻链或重链(根据需要修饰)的氨基酸序列,其

按照从N末端至C末端的顺序(除非另外指出)包含以下氨基酸区域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。“可变结构域”包括能够折叠成具有双重 β 折叠结构的规范域(VH或VL)的氨基酸序列,其中 β 折叠通过第一 β 折叠和第二 β 折叠的残基之间的二硫键连接。

[0155] 短语“互补决定区”或术语“CDR”包括由通常(即,在野生型动物中)出现在免疫球蛋白分子(如,抗体或T细胞受体)的轻链或重链的可变区中的两个骨架区之间的生物体免疫球蛋白基因的核酸序列编码的氨基酸序列。CDR可例如由种系序列或重排或未重排的序列,和例如由天然或成熟B细胞或T细胞编码。在一些情况下(如,对于CDR3而言),CDR可由两条或多条序列(如,种系序列)编码,所述序列不连续(如,在未重排的核酸序列中)但是如由于剪接或连接该序列(如,V-D-J重组形成重链CDR3)而在B细胞核酸序列中是连续的。

[0156] 短语“含Fc的蛋白质”包括抗体、双特异性抗体、免疫粘附素和包含免疫球蛋白CH2和CH3区的至少一个功能部分的其它结合蛋白。“功能部分”是指可以结合Fc受体(如,Fc γ R;或FcRn,即新生儿Fc受体)和/或可参与补体活化的CH2和CH3区。如果CH2和CH3区含有使其不能与任何Fc受体结合并且也不能激活补体的缺失、置换和/或插入或其它修饰,则CH2和CH3区不是有功能的。

[0157] 含Fc的蛋白质可以包含免疫球蛋白结构域中的修饰,包括当修饰影响结合蛋白的一种或多种效应子功能的修饰(例如,影响Fc γ R结合、FcRn结合以及因此半衰期和/或CDC活性的修饰)时。此类修饰包括但不限于就免疫球蛋白恒定区的EU编号而言的以下修饰及其组合:238、239、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、308、309、311、312、315、318、320、322、324、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、337、338、339、340、342、344、356、358、359、360、361、362、373、375、376、378、380、382、383、384、386、388、389、398、414、416、419、428、430、433、434、435、437、438和439。

[0158] 例如但不作为限制,结合蛋白是含Fc的蛋白并且表现出提高的血清半衰期(与没有一种或多种所述修饰的相同的含Fc蛋白相比)并且在位置250处具有修饰(如,E或Q);在250和428处具有修饰(如,L或F);在252处具有修饰(如,L/Y/F/W或T);在254处具有修饰(如,S或T);和在256处具有修饰(如,S/R/Q/E/D或T);或在428和/或433处具有修饰(如,L/R/SI/P/Q或K);和/或在434处具有修饰(如,H/F或Y);或在250和/或428处具有修饰;或在307或308处具有修饰(如,308F,V308F)和在434处具有修饰。在另一个实例中,修饰可包括428L(如,M428L)和434S(如,N434S)修饰;428L、259I(如,V259I)和308F(如,V308F)修饰;433K(如,H433K)和434(如,434Y)修饰;252、254和256(如,252Y、254T和256E)修饰;250Q和428L修饰(如,T250Q和M428L);307和/或308修饰(如,308F或308P)。

[0159] 一些重组含Fc的蛋白含有在生物系统中具有同源结合配偶体的受体或受体片段、配体或配体片段。“受体Fc-融合蛋白”是指含有与免疫球蛋白Fc结构域融合的可溶性受体的重组分子。一些受体Fc融合蛋白可含有影响给定的多种不同受体的配体结合结构域。那些受体Fc融合蛋白被称为“捕获剂”或“捕获剂分子”。利纳西普和阿柏西普分别是拮抗IL1R(参见美国专利No.7,927,583)和VEGF(参见美国专利No.7,087,411)的市售捕获剂的实例。其它重组含Fc的蛋白质包括含有与Fc结构域融合的肽的那些重组蛋白质,例如Centocor's MIMETIBODYTM技术。重组含Fc的蛋白质描述于C.Huang,“Receptor-Fc fusion therapeutics,traps,and MIMETIBODY technology,”20(6)Curr.Opin.Biotechnol.692-9

(2009)。

[0160] “Fc-融合蛋白”包含两种或多种蛋白质的部分或全部,其中之一是免疫球蛋白分子的Fc部分,其在天然状态下不融合。包含与抗体来源的多肽(包括Fc结构域)的各个部分融合的某些异源多肽的融合蛋白的制备,已经描述于例如Ashkenazi等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 88:10535,1991;Byrn等人,Nature 344:677,1990;和Hollenbaugh等人,“Construction of Immuno globulin Fusion Proteins”,Current Protocols in Immunology,增刊4,第10.19.1-10.19.11页,1992。“受体Fc融合蛋白”包含与Fc部分偶联的受体的一个或多个细胞外结构域中的一个或多个,其在一些实施方案中包含铰链区,随后是免疫球蛋白的CH2和CH3结构域。在一些实施方案中,Fc-融合蛋白含有结合至单个或多于一个配体的两条或多条不同的受体链。例如,Fc-融合蛋白是捕获剂,诸如例如IL-1捕获剂(如,利纳西普,其含有融合至与hIgG1的Fc融合的IL-1R1细胞外区的IL-1RAcP配体结合区;参见美国专利美国专利No.6,927,004,其通过引用整体并入本文)或VEGF捕获剂(如,阿柏西普,其含有融合至与hIgG1的Fc融合的VEGF受体Flk1的Ig结构域3的VEGF受体Flt1的Ig结构域2;如,SEQ ID NO:1;参见美国专利No.7,087,411和7,279,159,其通过引用整体并入本文)。

[0161] “VEGF拮抗剂”是指拮抗或以其它方式降低血管内皮生长因子(VEGF)活性的任何和所有药物、医药或其它分子。VEGF是PDGF生长因子家族的成员。它主要作用于内皮细胞以促进有丝分裂和细胞迁移,并从而刺激血管发生和血管生成。VEGF可以用于异位治疗局部缺血,特别是缺血性心脏病。相反,VEGF拮抗剂可用于抑制血管生成。抗血管生成剂可用于治疗癌症,因为肿瘤需要新血管形成以继续生长和转移,并且用于治疗导致湿性年龄相关性黄斑变性的脉络膜新血管形成。关于VEGF和用于促进或抑制VEGF活性的药物的综述,参见Wu等人,“A systems biology perspective on sVEGFR1:its biological function, pathogenic role and therapeutic use,”14(3)J.Cell Mol.Med.528-52(2010);Yadav等人,“Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors:A Review,”9(6)J.Clin.Diagn.Res.XE01-XE05(2015);和I.Zachary,“VEGF signalling:integration and multi-tasking in endothelial cell biology,”31(Pt 6)Biochem.Soc.Trans.1171-7(2003)。

[0162] VEGF抑制剂包括抑制VEGF-刺激的酪氨酸激酶的小分子,包括例如拉帕替尼、舒尼替尼、索拉非尼、阿西替尼和帕索帕尼(Yadav,2015)。VEGF的大分子抑制剂包括单克隆抗体贝伐单抗、Fab片段雷珠单抗、捕获剂阿柏西普和聚乙二醇化适体派加他尼(Id)。

[0163] 涉及血管生成并充当治疗性靶标新血管形成的其它生长因子尤其包括血管生成素-2(Ang2)和血小板来源的生长因子(PDGF)。Ang2是血管生成素-Tie(AT)途径中的一个组分,并且因此参与血管重塑。其中血管生成素-1结合并激动Tie2同源受体的AT途径促进内皮细胞存活以及血管的建立、成熟和维持。Ang2也参与淋巴管生成。Ang2也结合至并调节Tie2信号传导,并且在Ang1存在下似乎起着Tie2拮抗剂的作用。参见Thurston和Daly,“The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway,”2(9)Cold Spring Harb.Perspect.Med.a006650(2012),和Chintharlapalli等人,“Angiopoietin-2:an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy,”73(6)Cancer Res.1649-57(2013)。

[0164] Ang2参与癌症和炎症。它在各种癌、细胞瘤和肉瘤中,以及在败血症和炎症疾病中上调。Ang2在白细胞募集中起作用。Ang2的阻断导致部分抑制人类肿瘤异种移植物的生长。(Thurston,2012.)与Ang2结合的Ang2抗体和其它肽抑制剂正在开发中,以用于治疗由血管生成引起或恶化的疾病和疾患。抗Ang2抗体描述于,例如,美国专利No.6,166,185;7,521,053;7,205,275;和美国专利申请公开No.2006/0018909;2006/0246071;2006/068953;2007/0154482;和2011/0027286。

[0165] PDGF系统含有二聚体生长因子配体家族和受体酪氨酸激酶。它包括五(5)种配体的同种型:PDGF-AA,PDGF-BB,PDGF-CC,PDGF-DD和PDGF-AB;和两(2)种受体:PDGFRA(α 受体)和PDGFRB(β 受体)。PDGF参与胚胎细胞分裂以及后期发育中的组织重塑和血管生成。激酶抑制剂,例如,索拉非尼、尼罗替尼、达沙替尼、舒尼替尼、宁替尼布和伊马替尼是用于治疗癌症的有用的PDGF抑制剂。一些抗PDGFR抗体也在开发中以拮抗PDGF信号传导以用于治疗癌症和其它血管生成相关疾病。参见Kono等人,“Adding to the mix: fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor receptor pathways as targets in non-small cell lung cancer,”12(2) Curr.Cancer Drug Targets 107-23 (2012); Bauman等人,“Antagonism of Platelet-Derived Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer: Rationale and Investigations,”13 Clin.Cancer Res.4632s (2007); 和 Stock等人,“Platelet-derived growth factor receptor- α : a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer,”6 Mol.Cancer Ther.1932-41 (2007); 美国专利No.5,468,468;7,740,850;8,425,911;和8,574,578;和8,574,578;和美国专利申请No.2009/0053241;2011/0177074;2012/0009199;2012/0027767;和2014/0193402。

[0166] 主题经配制的药物粉末可以由水溶液(前体)原料制造。因此,所提供的蛋白质可以以一定的浓度包含在原料中。蛋白质的浓度以及原料中的总溶质浓度可影响所得粉末成分蛋白质微粒的尺寸,因此,微粒的尺寸可通过调节原料中的蛋白质浓度或其它溶质浓度来控制。虽然不希望受理论束缚,但原料中较低浓度的蛋白质或其它溶质可产生含较小成分蛋白质微粒的较细粉末。原料中较高浓度的蛋白质或其它溶质可产生含较大成分蛋白质微粒的较粗粉末。

[0167] 前体水溶液中蛋白质的浓度范围可以低至1mg/mL或更低至尽可能多,诸如约175-200mg/mL或更高。在一些实施方案中,前体水溶液含有以下浓度的主题蛋白质:约1mg/mL至约500mg/mL的蛋白质;约5mg/mL至约400mg/mL的蛋白质;约5mg/mL至约200mg/mL的蛋白质;约25mg/mL至约180mg/mL的蛋白质;约25mg/mL至约150mg/mL的蛋白质;或约50mg/mL至约180mg/mL的蛋白质。在一些实施方案中,前体水溶液含有以下浓度的主题蛋白质:约1mg/mL;约2mg/mL;约5mg/mL;约10mg/mL;约15mg/mL;约20mg/mL;约25mg/mL;约30mg/mL;约35mg/mL;约40mg/mL;约45mg/mL;约50mg/mL;约55mg/mL;约60mg/mL;约65mg/mL;约70mg/mL;约75mg/mL;约80mg/mL;约85mg/mL;约86mg/mL;约87mg/mL;约88mg/mL;约89mg/mL;约90mg/mL;约95mg/mL;约100mg/mL;约105mg/mL;约110mg/mL;约115mg/mL;约120mg/mL;约125mg/mL;约130mg/mL;约131mg/mL;约132mg/mL;约133mg/mL;约134mg/mL;约135mg/mL;约140mg/mL;约145mg/mL;约150mg/mL;约155mg/mL;约160mg/mL;约165mg/mL;约170mg/mL;约175mg/mL;约180mg/mL;约185mg/mL;约190mg/mL;约195mg/mL;约200mg/mL;约205mg/mL;约210mg/mL;约215mg/mL;约220mg/mL;约225mg/mL;约230mg/mL;约235mg/mL;约240mg/mL;约

245mg/mL; 约250mg/mL; 约255mg/mL; 约260mg/mL; 约265mg/mL; 约270mg/mL; 约275mg/mL; 约280mg/mL; 约285mg/mL; 约200mg/mL; 约200mg/mL; 或约300mg/mL。

[0168] 如上所述, 治疗性蛋白质可以是抗原结合蛋白, 诸如抗体、抗体片段、捕获剂分子或其它受体Fc-融合蛋白、可溶性受体等。在一个具体的实施方案中, 治疗性蛋白质是阿柏西普、VEGF拮抗剂捕获剂分子。用于形成含阿柏西普的微粒的原料溶液可含有约1mg/mL至约100mg/mL的阿柏西普、约2mg/mL、约3mg/mL、约4mg/mL、约5mg/mL、约6mg/mL、约7mg/mL、约8mg/mL、约9mg/mL、约10mg/mL、约15mg/mL、约20mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、约40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约55mg/mL、约60mg/mL、约65mg/mL、约70mg/mL、约75mg/mL、约80mg/mL、约85mg/mL、约90mg/mL、约95mg/mL或约100mg/mL VEGF捕获剂蛋白。溶液可以含有一种或多种约5mM至约50mM的缓冲剂。在一个实施方案中, 缓冲剂是在约 6 ± 0.5 的pH下的约10mM磷酸盐。

[0169] 在一些实施方案中, 主题经配制的药物粉末的蛋白质微粒用聚合物包衣。术语“聚合物”包括包含通过共价化学键连接的重复单体的大分子。用于治疗性微粒的有用聚合物是生物相容性和生物可降解的。生物相容性或生物可降解的聚合物可以是天然的或合成的。天然聚合物包括多核苷酸、多肽诸如天然存在的蛋白质、重组蛋白质、明胶、胶原蛋白、纤维蛋白, 丝心蛋白、聚天冬氨酸、聚谷氨酸、聚亮氨酸、亮氨酸-谷氨酸酯-共聚物; 和多糖, 诸如纤维素藻酸盐、葡聚糖和葡聚糖水凝胶聚合物、直链淀粉、菊粉、果胶和瓜尔胶、壳聚糖、几丁质、肝素和透明质酸。合成的生物相容性或可生物降解的聚合物包括聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸-聚乙醇酸共聚物(PLGA)、聚-D,L-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)、PLGA-环氧乙烷延胡索酸酯、酯化至聚乙二醇1000的PLGA- α -生育酚琥珀酸酯(PLGA-TGPS)、聚酸酐聚[1,6-双(对羧基苯氧基)己烷](pCPH)、聚(羟基丁酸-共聚羟基戊酸)(PHB-PVA)、聚乙二醇-聚(乳酸)共聚物(PEG-PLA)、聚- ϵ -己内酯(PCL)、聚-烷基-氰基-丙烯酸酯(PAC)、聚(乙基)氰基丙烯酸酯(PEC)、聚异丁基氰基丙烯酸酯、聚-N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(聚(HPMA))、聚- β -R-羟基丁酸酯(PHB)、聚- α -R-羟基链烷酸酯(PHA)、聚- β -R-苹果酸、磷脂-胆固醇聚合物、2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱/聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DOPC/PEG-DSPE)/胆固醇、乙基纤维素、环糊精(CD)-基聚轮烷和聚假轮烷、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚原酸酯、聚原酸酯-聚脒共聚物、聚原酸酯-二胺共聚物、掺入了潜酸以控制降解速率的聚原酸酯以及尤其是聚(乙二醇)/聚(对苯二甲酸丁二醇酯)共聚物。

[0170] 乙基纤维素(EC)是用于医药和食品科学的众所周知且容易获得的生物材料。它是其中一些葡萄糖羟基基团被乙醚替代的纤维素衍生物。Martinac等人, 22(5) J. Microencapsulation 549-561 (2005) 并入本文以使用乙基纤维素作为生物相容性聚合物来制造微球体。本文并入US 4,210,529的乙基纤维素和乙基纤维素的衍生物。

[0171] 聚-D,L-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)也是众所周知的美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的用于组织工程化和药物递送系统的生物相容性和生物可降解的聚合物。PLGA是包含乙醇酸和乳酸单体的聚酯。Astete和Sabliov, 17(3) Biomater. Sci. Polym. Ed. 247-89 (2006) 并入本文以用于PLGA的合成和PLGA纳米颗粒的制造。

[0172] 聚- ϵ -己内酯(PCL)是FDA批准的用于人类的作为药物递送装置的另一种生物相容性和生物可降解的聚合物。PCL是 ϵ -己内酯的聚酯, 其在体内迅速水解形成无毒或低毒的羟

基羧酸。Labet和Thielemans,38Chemical Society Reviews 3484-3504 (2009) 并入本文以用于制造PCL。Sinha等人,278 (1) Int. J. Pharm. 1-23 (2004) 并入本文以用于制造基于PCL的微球体和纳米球体。

[0173] 聚原酸酯 (POE) 是一种经设计用于药物递送的生物可蚀解聚合物。它通常是烯酮缩醛的聚合物,优选环状二乙烯酮缩醛,诸如如3,9-二亚甲基-2,4,8,10-四氧杂螺[5.5]-十一烷,其经由乙二醇缩合聚合以形成原酸酯键联。聚原酸酯可以经修饰以通过交换进出各种疏水性二醇和多元醇来控制它们的药物释放特性和降解速率,诸如如用癸三醇替代己三醇,以及加入潜酸诸如如,辛二酸等至主链以提高pH敏感性。对聚原酸酯的其它修饰包括胺的整合以增加官能度。US 5,968,543;US 4,764,364;US 4,304,767;Heller和Barr,5 (5) Biomacromolecules 1625-32 (2004);和Heller,57Adv. Drug. Deliv. R ev. 2053-62 (2005) 并入本文以用于聚原酸酯。

[0174] 聚乙二醇 (PEG) 可以被交联以形成凝胶,其中掺入了蛋白质微粒。Gibas和Janik,“Review:synthetic polymer hydrogels for biomedical applications,”4 (4) Chemistry&Chemical Technology 297-304 (2010) 并入本文以用于交联的PEG凝胶。

[0175] 对于在喷雾干燥时施加热的应用是优选的聚合物具有高玻璃转化温度。在一些实施方案中,高玻璃转化温度 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 20^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 25^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 35^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 45^{\circ}\text{C}$ 或 $\geq 30^{\circ}\text{C}$ 。

[0176] 一方面,本发明提供了通过“喷雾干燥”含有主题蛋白质和任何另外的赋形剂(又称如本文所述的“原料”)的前体水溶液来制造主题经配制的药物粉末的方法。术语“喷雾干燥”意指通过使用喷雾干燥器从溶液、浆液或混悬液制备包含微米级颗粒的粉末的方法。喷雾干燥器使用雾化器或喷嘴以将混悬液或浆液分散成可控液滴尺寸喷雾。可以通过喷雾干燥产生10-500 μm 的液滴尺寸。当溶剂(水或有机溶剂)干燥时,蛋白质物质干燥成微米尺寸的颗粒(即蛋白质微粒),形成粉末状物质;或者在蛋白质微粒-聚合物混悬液的情况下,在蛋白质负载周围形成聚合物硬化壳。喷雾干燥可以在设备上进行:诸如,如BÜCHI迷你喷雾干燥器B-290 (BÜCHI Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, CH)。Elversson&Millqvist-Fureby,“Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein,”294 (1,2) International Journal of Pharmaceutics 73-87 (2005) 通过引用喷雾干燥并入本文。

[0177] 在一个具体的实施方案中,将原料以约2mL/min至约15mL/min或约7mL/min的速率泵入喷雾干燥器中。在一个实施方案中,喷嘴压力为约35psi至约100psi。在一个实施方案中,喷嘴压力约为75psi。喷雾干燥器的入口温度设定为等于或高于水的沸点的温度,诸如如约100 $^{\circ}\text{C}$ 至约130 $^{\circ}\text{C}$ 。出口温度处于低于水的沸点且高于环境温度的温度,诸如如约55 $^{\circ}\text{C}$ 。在一个具体的实施方案中,将蛋白质溶液(如VEGF捕获剂溶液或IgG溶液)以约7mL/min泵入BÜCHI迷你喷雾干燥器B-290中,其入口温度为约100 $^{\circ}\text{C}$ 、110 $^{\circ}\text{C}$ 、120 $^{\circ}\text{C}$ 或130 $^{\circ}\text{C}$ 且出口温度为约55 $^{\circ}\text{C}$,抽吸器设定为33m³/h且喷雾气体为530L/h。

[0178] 在一个实施方案中,经配制的药物粉末通过使主题原料进行雾化以形成雾化液滴雾且然后对雾化液滴雾施加热以形成包含蛋白质的经配制的药物粉末而形成。在一些实施方案中,所得经配制的药物粉末经受另外的干燥(又称“二次干燥”)。另外的干燥包括烘烤、

冻干和氮气流。在其它实施方案中,所得经配制的药物粉末不经受另外的干燥。在一些实施方案中,所得经配制的药物粉末不经受随后的烘烤。在一些实施方案中,所得经配制的药物粉末不经历随后的冻干。在一些实施方案中,所得经配制的药物粉末不经受随后的氮气流干燥。

[0179] 在一个实施方案中,原料包含质量比为1:50-2:5或在1:50-2:5之间的热稳定剂和糖蛋白。在一个实施方案中,对于每5个重量份的蛋白质,原料含有 ≤ 2 个重量份的热稳定剂。例如,如果原料含有5mg/ml的蛋白质,则热稳定剂的总量将被以 ≤ 2 mg/ml包含以维持在如上文所述的经配制的药物粉末中的5份蛋白质与 ≤ 2 份热稳定剂的比率。在一个实施方案中,对于每5个重量份的蛋白质,原料含有 ≤ 1 个重量份的热稳定剂。例如,如果原料为5mg/ml蛋白质,则热稳定剂的总量将被以 ≤ 1 mg/ml包含以维持在如上文所述的经配制的药物粉末中的5个重量份蛋白质与1个重量份热稳定剂的比率。在一些实施方案中,蛋白质与热稳定剂的重量与重量比为5:2-100:1、5:2-10:3、20:7-4:1、10:3-5:1、4:1-20:3、5:1-10:1、20:3-20:1、10:1-40:1、20:1-50:1或40:1-100:1。

[0180] 在另一个实施方案中,对于每摩尔的蛋白质,原料含有 < 300 摩尔的热稳定剂。例如,如果原料含有1mM蛋白质,则热稳定剂的总量将被以 < 300 mM包含以维持在如上文所述的所得经配制的药物粉末中的热稳定剂与蛋白质的比率 $< 300:1$ 。在一些实施方案中,热稳定剂与蛋白质的摩尔比为350:1-1:1、350:1-300:1、325:1-275:1、300:1-250:1、275:1-225:1、250:1-200:1、225:1-175:1、200:1-150:1、175:1-125:1、150:1-100:1、125:1-75:1、100:1-50:1、75:1-25:1或50:1- $\leq 1:1$ 。

[0181] 在又一个实施方案中,原料含有主题蛋白质而不含热稳定剂。

[0182] 在一个实施方案中,如上所述,所得经配制的药物粉末是干透的。

[0183] 在另一个实施方案中,如上所述,所得经配制的药物粉末不是干透的。在一些实施方案中,非干透的经配制的药物粉末包含约3%至约10% (w/w) 水、3.5%-10% (w/w) 水、4%-10% (w/w) 水、4.5%-10% (w/w) 水、5%-10% (w/w) 水、5.5%-10% (w/w) 水、6%-10% (w/w) 水、6.5%-10% (w/w) 水、7%-10% (w/w) 水、7.5%-10% (w/w) 水、8%-10% (w/w) 水、8.5%-10% (w/w) 水、9%-10% (w/w) 水、9.5%-10% (w/w) 水、 $> 3\%$ -9% (w/w) 水、 $> 3\%$ -9% (w/w) 水、 $> 3\%$ -8.5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -8% (w/w) 水、 $> 3\%$ -7.5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -7% (w/w) 水、 $> 3\%$ -6.5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -6% (w/w) 水、 $> 3\%$ -5.5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -4.5% (w/w) 水、 $> 3\%$ -4% (w/w) 水、 $> 3\%$ -3.5% (w/w) 水、约3.1% (w/w) 水、约3.5% (w/w) 水、约4% (w/w) 水、约4.5% (w/w) 水、约5% (w/w) 水、约5.5% (w/w) 水、约6% (w/w) 水、约6.5% (w/w) 水、约7% (w/w) 水、约7.5% (w/w) 水、约8% (w/w) 水、约8.5% (w/w) 水、约9% (w/w) 水、约9.5% (w/w) 水或约10% (w/w) 水。

[0184] 在一些实施方案中,主题原料的热稳定剂包含蔗糖或海藻糖,或海藻糖和蔗糖的组合。

[0185] 在其它实施方案中,主题原料的热稳定剂不包含分子量大于200g/mol的分子。在一些实施方案中,主题原料的热稳定剂选自由甘露糖醇、异亮氨酸、脯氨酸及其组合组成的组。

[0186] 在其它实施方案中,主题原料的热稳定剂包含与甘露糖醇、异亮氨酸或脯氨酸组合的海藻糖或蔗糖。

[0187] 在一个实施方案中,主题原料还含有缓冲剂。优选的缓冲剂包括磷酸盐、乙酸盐和组氨酸。在一个实施方案中,原料包含0.5mM-10mM的缓冲剂。

[0188] 在一个实施方案中,主题原料不含缓冲剂。在这里,原料由主题蛋白本身和水缓冲。

[0189] 在一个实施方案中,主题原料还含有非离子去污剂。非离子去污剂包括聚山梨醇酯诸如聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。在一个实施方案中,非离子表面活性剂以0.01-0.2% (w/v) 的浓度存在于原料中。

[0190] 在一些实施方案中,主题原料含有主题蛋白质,(i) 一种或多种缓冲剂,(ii) 一种或多种热稳定剂,(iii) 和/或一种或多种表面活性剂中的一种或多种。在一个实施方案中,水溶液含有2-200mg/ml的蛋白质、0.5-2% (w/v) 的一种或多种热稳定剂、1-10mM的一种或多种缓冲剂和0.005-0.3% (w/v) 的一种或多种表面活性剂。在具体实施方案中,水溶液包含50mg/ml的蛋白质、2%w/v的一种或多种热稳定剂、10mM缓冲剂和0.015%至0.1%w/v的一种或多种非离子表面活性剂。在另一个具体的实施方案中,水溶液包含5mg/ml的蛋白质、0.2%w/v的一种或多种热稳定剂、1mM缓冲剂和0.015%至0.1%w/v的一种或多种非离子表面活性剂。

[0191] 在另一个实施方案中,由主题原料形成的粉末成分蛋白微粒随后用生物可降解聚合物包衣。在一些实施方案中,将主题经配制的药物粉末混悬于聚合物溶液中。在一个实施方案中,聚合物溶液通过将聚合物溶解在有机聚合物(诸如甲叉二氯、四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醇或一些其它有用的溶剂)中而形成。乙酸乙酯被广泛称为安全溶剂,且常用于制备药物、植入物和食品。

[0192] 在一些实施方案中,聚合物可以是乙基纤维素(“EC”)、聚(乳酸)(“PLA”)、聚原酸酯(“POE”)、聚-D,L-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)或聚-ε-己内酯(“PCL”)。在一些实施方案中,聚合物可以是、聚乙醇酸(PGA)、交联的聚乙二醇(PEG)、聚-D,L-丙交酯-共-乙交酯(PLGA)、PLGA-环氧乙烷延胡索酸酯、酯化至聚乙二醇1000的PLGA-α-生育酚琥珀酸酯(PLGA-TGPS)、聚酸酐聚[1,6-双(对羧基苯氧基)己烷](pCPH)、聚(羟基丁酸-共聚羟基戊酸)(PHB-PVA)、聚乙二醇-聚(乳酸)共聚物(PEG-PLA)、聚-ε-己内酯(PCL)、聚-烷基-氰基-丙烯酸酯(PAC)、聚(乙基)氰基丙烯酸酯(PEC)、聚异丁基氰基丙烯酸酯、聚-N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(聚(HPMA))、聚-β-R-羟基丁酸酯(PHB)、聚-β-R-羟基链烷酸酯(PHA)、聚-β-R-苹果酸、磷脂-胆固醇聚合物、2-二油酰基-sn-甘油基-3-磷脂酰胆碱/聚乙二醇-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(DOPC/PEG-DSPE)/胆固醇、多糖、纤维素、乙基纤维素、甲基纤维素、藻酸盐、葡聚糖和葡聚糖水凝胶聚合物、直链淀粉、菊粉、果胶和瓜尔胶、壳聚糖、几丁质、肝素、透明质酸、环糊精(CD)基聚轮烷和聚假轮烷、聚天冬氨酸、聚谷氨酸、聚亮氨酸、亮氨酸-谷氨酸共聚物、聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、明胶、胶原、纤维蛋白、丝心蛋白、聚原酸酯、聚原酸酯-聚脒共聚物、聚原酸酯-二胺共聚物、掺入了潜酸的聚原酸酯、聚(乙二醇)/聚(对苯二甲酸丁二醇酯)共聚物及其组合和共聚物。

[0193] 聚合物可以以约10mg/mL至约300mg/mL(即,1%-30% [w/v])、约15mg/mL至约295mg/mL、约20mg/mL至约290mg/mL、约25mg/mL至约280mg/mL、约30mg/mL至约270mg/mL、约35mg/mL至约265mg/mL、约40mg/mL至约260mg/mL、约45mg/mL至约260mg/mL、约50mg/mL至约255mg/mL、约55mg/mL至约250mg/mL、约20mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、约

40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约75mg/mL、约100mg/mL、约125mg/mL、约150mg/mL、约175mg/mL、约200mg/mL、约225mg/mL或约250mg/mL的浓度溶解于溶剂(如乙酸乙酯)中。在一个实施方案中,喷雾干燥器的内部进料中的聚合物浓度 $\leq 10\%$ (w/v) 并且外部进料的聚合物浓度 $\leq 25\%$ (w/v)。

[0194] 然后将主题经配制的蛋白质粉末以约10mg/mL至约100mg/mL、约15mg/mL至约95mg/mL、约20mg/mL至约90mg/mL、约25mg/mL至约85mg/mL、约30mg/mL至约80mg/mL、约35mg/mL至约75mg/mL、约40mg/mL至约70mg/mL、约45mg/mL至约65mg/mL、约50mg/mL至约60mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、约40mg/mL、约45mg/mL或约50mg/mL添加至聚合物溶液。将粉末和聚合物溶液混合形成浆液或混悬液,然后使其经受分散和干燥以形成聚合物包衣的经配制的药物粉末。优选的聚合物溶液含有溶解在溶剂中的聚合物,所述溶剂不溶解混悬的蛋白质颗粒或其赋形剂。例如,在其中粉末含有蔗糖作为赋形剂的那些实施方案中,乙醇不是优选的,因为蔗糖可以溶解到乙醇中,并将蛋白质留在其不溶解的颗粒中。

[0195] 在一个实施方案中,将粉末和聚合物浆液或混悬液进行喷雾干燥,其以类似于用于制造主题经配制的药物粉末的方法的方式进行,但是具有降低的进口温度(T_{in})以防止点燃有机溶剂或聚合物。例如,当有机溶剂是二氯甲烷时, T_{in} 可能是 40°C ;当溶剂是乙酸乙酯时, T_{in} 可能是 77°C ;并且当溶剂是乙醇时, T_{in} 可能是 78°C 。简而言之,将粉末和聚合物浆液或混悬液以约0.5mL/min至约20mL/min、约1.2mL/min、约2.6mL/min或约12.5mL/min的速率泵入喷雾干燥器中。在一个实施方案中,使用双进料喷嘴喷雾干燥器来雾化浆液。在一个实施方案中,聚合物溶液的粘度在 20°C 时 < 20 厘泊。在一个实施方案中,内部进料的聚合物浓度 $\leq 10\%$ (w/v) 并且外部进料的聚合物浓度 $\leq 25\%$ 。在一个实施方案中,微粒以 $< 10\%$ (w/v) 混悬于聚合物溶液中。在一个实施方案中, T_{in} 取决于溶剂,例如,对于二氯甲烷为 40°C ,对于乙酸乙酯为 77°C ,且对于乙醇为 78°C 。在一个实施方案中, T_{out} 小于主题经配制的药物粉末的玻璃转化温度并且是 T_{in} 、流速、溶剂和抽吸器的函数。在一个实施方案中,喷嘴的 $T_{max} < 150^{\circ}\text{C}$ 。在一个实施方案中,外部通道的最大流速为约1.2mL/min且内部通道的最大流速为约2.6mL/min。在一个实施方案中,喷雾干燥器的超声波仪的功率为约0.5-2W且抽吸器设定为约80%。

[0196] 所得聚合物包衣的经配制的药物粉末含有被聚合物皮层(polymer cortex)包围的成分蛋白质微粒。这种聚合物包衣的蛋白质微粒可以具有多种构造中的任何一种。在一个实施方案中,一些聚合物包衣的蛋白质微粒含有1至50、1至40、1至30、1至20、1至10或1至5个嵌入单个聚合物包衣的蛋白质微粒中的蛋白质微粒。在一些实施方案中,各个聚合物-包衣的蛋白质微粒含有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50个蛋白质微粒。在一些实施方案中,经配制的药物粉末含有具有1-2、2-3或3-4个蛋白质微粒的模式聚合物包衣的蛋白质微粒。

[0197] 在一些实施方案中,聚合物-包衣的蛋白质微粒的直径范围为约 $2\mu\text{m}$ 至约 $70\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 至约 $65\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 至约 $60\mu\text{m}$ 、约 $15\mu\text{m}$ 至约 $55\mu\text{m}$ 、约 $20\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 、约 $15\mu\text{m}$ 、约 $20\mu\text{m}$ 、约 $25\mu\text{m}$ 或约 $30\mu\text{m}$ 。尽管蛋白核的直径可能在一定程度上对尺寸变化有贡献,但大部分的尺寸变化反映了聚合物皮层的厚度。操纵聚合物溶液或聚合物本身的起始浓度可用于控制最终微米

级颗粒的直径。

[0198] 在一些实施方案中,使所得的聚合物包衣的经配制的药物粉末经受另外的干燥(又称“二次干燥”)。另外的干燥包括烘烤、冻干和氮气流。在其它实施方案中,所得的聚合物包衣的经配制的药物粉末不经受另外的干燥。在一些实施方案中,所得的聚合物包衣的经配制的药物粉末不经受随后的烘烤。在一些实施方案中,所得的聚合物包衣的经配制的药物粉末不经受随后的冻干。在一些实施方案中,所得的聚合物包衣的经配制的药物粉末不经受随后的氮气流干燥。

[0199] 本发明的聚合物包衣的微粒可用于蛋白质治疗剂的时间释放或延长释放。例如,可以设想阿柏西普微粒可用于玻璃体中阿柏西普的延长释放以用于治疗血管性眼病,或皮下植入以用于延长释放VEGF捕获剂以治疗癌症或其它病症。

[0200] 2013年5月23日公布的美国公开专利申请No.US 2013/0129830 A1和2016年10月7日提交的美国临时申请No.62/405,610通过引用整体并入本文。

实施例

[0201] 提出下面的实施例以便提供向本领域的技术人员提供如何制造和使用本发明的方法和组合物的描述,并且不旨在限制发明者所认为的其发明内容的范围。

[0202] 实施例1:喷雾干燥参数

[0203] 公开了经由对含有蛋白质的水性原料溶液采用喷雾干燥步骤而生产含有蛋白质的经配制的药物粉末的方法。使用BUCHI B-290迷你喷雾干燥器(Flawil,CH)使含有50mg/mL阿普西柏、10mM磷酸盐(pH 6.2)和2%w/v蔗糖的原料溶液经受喷雾干燥。此处,入口温度以10度增量从100℃变化到130℃,并且所得颗粒的ECD由MFI确定。如图1所示,干燥气体的入口温度不影响蛋白质微粒的尺寸分布或形态。

[0204] 在每个入口温度下,小于1%的所得颗粒的尺寸大于10微米。瞬时暴露于高温和蒸发冷却防止喷雾干燥时阿柏西普蛋白质降解。

[0205] 实施例2:蛋白质完整性和稳定性

[0206] 评估喷雾干燥后经配制的药物粉末中阿柏西普的分子完整性。将复溶的阿柏西普粉末与用于眼用注射的液体阿柏西普制剂以及含有阿柏西普的前体原料制剂进行比较。眼用制剂包含40mg/mL阿柏西普、5% (w/v) 蔗糖、0.03% (w/v) 聚山梨醇酯20、40mM NaCl和10mM磷酸盐,pH 6.2。喷雾干燥前的原料和复溶的喷雾干燥的制剂包含50mg/mL阿普西柏、2% (w/v) 蔗糖和10mM磷酸盐,pH 6.2。喷雾干燥后经配制的药物粉末中的阿柏西普维持其天然性(nativity)和生物效力(参见表5)。

[0207] 通过测量高分子量物质的形成评估喷雾干燥的粉末中阿柏西普的稳定性。在3个月、6个月和12个月时在37℃下高分子量(HMW)物质的形成通过复溶蛋白质的SE-UPLC测定。将喷雾干燥的阿柏西普粉末在37℃下在干燥条件下孵育,然后复溶为50mg/mL阿柏西普以用于分析。HMW物质的形成速率通过在37℃下收集多达3个月、6个月或12个月的时间点的平方根时间的线性回归来确定。表6中描绘的结果表明喷雾干燥的阿柏西普的聚集速率在药学上可接受的参数内。

[0208] 表5:喷雾干燥的阿柏西普的完整性

[0209]

		眼科制剂 阿普西柏	喷雾干燥前 的阿柏西普	复溶的喷 雾干燥的 阿柏西普
回收%(RP-HPLC)		99	100	96
纯 度 (SE-UPLC)	天然%	99.3	99.1	99.0
电 荷 变 异 分	主要%	79.5	79.9	79.8

[0210]

		眼科制剂 阿普西柏	喷雾干燥前 的阿柏西普	复溶的喷 雾干燥的 阿柏西普
析 (iCIEF)				
通 过 SDS-PAGE 确 定的纯度 (非还原的)	主要%	97.0	97.5	96.9
通 过 SDS-PAGE 确 定的纯度 (还原的)	主要%	99.0	99.0	99.0
mDSC	T _m 1(°C)	67.6	-	67.3
	T _m 2(°C)	85.3	-	85.6
FTIR	α-螺旋%	8.3	-	8.3
	β-折叠%	39.2	-	39.5
相对效力%(生物测定)		84	109	103

[0211] 表6:阿柏西普喷雾干燥的经配制的粉末的稳定性

[0212]

粒度	热稳定剂+ 基础制剂 (50 mg/mL 阿柏西普, 10mM 磷酸盐, pH 6.2)	在 37°C下阿柏西普 HMW 物质形成的速率 (通过 SE-UPLC 确定的% HMW/ $\sqrt{\text{mo}}$)
5 μm	1% w/v 蔗糖	5.7%
5 μm	2% w/v 蔗糖	3.7%

[0213] 实施例3:热稳定剂

[0214] 显示加入赋形剂至原料以提高微粒蛋白质的热稳定性。将冻干和喷雾干燥的阿柏西普(即由5mg/mL阿柏西普原料制成的2.5微米颗粒)在50°C下在干燥条件下孵育并复溶为5mg/mL阿柏西普用于分析。结果描绘于表7中。含有甘露糖醇和异亮氨酸的制剂的粉末可流动性似乎与仅含有蔗糖或海藻糖的那些制剂的可流动性相似。包含甘露糖醇和异亮氨酸提高了包含更小(即2.5 μm)颗粒的喷雾干燥的制剂的热稳定性。

[0215] 表7:2.5微米蛋白质微粒的热稳定性

[0216]

形式	粒度	热稳定剂+ 基础制剂 (5 mg/mL 阿柏西普, 1 mM 磷酸盐, pH 6.2)	在 50°C下 HMW 阿柏西普 物质形成的速率 (通过 SE-UPLC 确定的% HMW/ $\sqrt{\text{mo}}$)
喷雾 干燥	2.5 μm	0.2% w/v 蔗糖	8.5%
喷雾 干燥	2.5 μm	0.2% w/v 海藻糖	8.8%
喷雾 干燥	2.5 μm	0.1% w/v 蔗糖 0.05% w/v 甘露糖醇 0.05% w/v Ile	5.9%
喷雾 干燥	2.5 μm	0.1% w/v 海藻糖 0.05% w/v 甘露糖醇 0.05% w/v Ile	5.7%
喷雾 干燥	2.5 μm	0.1% w/v 甘露糖醇 0.1% w/v Ile	7.0%

[0217] 实施例4:粒度和形状

[0218] 评估喷嘴入口温度、包含表面活性剂、阿柏西普溶质浓度以及包含热稳定剂对粒度或形状的影响。蛋白质浓度和包含表面活性剂各自导致更小-并且在表面活性剂的情况下,更圆的微粒。表8中总结了这些结果。

[0219] 表8:粒度和形状

[0220]	喷雾干燥参数	对粒度的影响	对颗粒形态的影响	对蛋白稳定性的影响
	入口温度 (110-130°C)	无	无	无
	+ 聚山梨醇酯 20 ($<0.1\%$ w/v)	减少	更球形	无
	↓溶质浓度	减少	无	喷雾干燥后增加的 HMW 物质($\sim 0.3\%$)
	+热稳定剂	无	无	在干热应力条件下 降低的 HMW 形成 速率。量级取决于热 稳定剂的数量和类 型。

[0221] 如实施例1中所述,入口温度以10度增量从100°C变化至130°C,并且所得颗粒的ECD由MFI确定。如图1所示,干燥气体的入口温度不影响粒度分布或形态。在每个入口温度下,小于1%的所得颗粒的尺寸大于10微米。

[0222] 与不含聚山梨醇酯20的原料溶液相比,向原料添加0.03%-0.1%w/v聚山梨醇酯20在喷雾干燥时产生更多的小颗粒(图2)。来自含有超过0.1%w/v聚山梨醇酯20的制剂的粉末表现出更多的附聚物并且可流动性较差(即,更粘)。低流动粉末难以在下游工艺中处理。因此,含有小于0.1%w/v聚山梨醇酯20的制剂是优选的。还发现向原料溶液中添加0.03%w/v聚山梨醇酯20在喷雾干燥时产生更球形的颗粒(即,更高的纵横比[短轴/长轴](参见图3))。

[0223] 原料溶液中更低的溶质浓度将喷雾干燥的阿柏西普粒度降低至约 $2.5\mu\text{m}$ (与 $5\mu\text{m}$ 相比)。使用50mg/mL阿普西柏、10mM磷酸盐(pH 6.2)、2%蔗糖(w/v)作为原料溶液的喷雾干燥方法产生直径 $\sim 5\mu\text{m}$ 的颗粒。原料溶液中溶质浓度降低10倍(即5mg/mL阿普西普、1mM磷酸盐[pH 6.2]、0.2%蔗糖[w/v])将蛋白质微粒尺寸减半至 $\sim 2.5\mu\text{m}$ (参见图4)。这代表颗粒体积的8倍减小(2^3)。喷雾干燥更稀释的原料需要多10倍的时间($\sim 1\text{hr/g}$)以产生与更高浓度制剂相同量的粉末。在喷雾干燥过程中更小蛋白质微粒的更大表面积与体积比结合更久的出口温度暴露可能对蛋白质造成压力,并可能在一定程度上损害稳定性。

[0224] 实施例5:聚合物包衣

[0225] 本发明的蛋白质微粒可以用聚合物包衣。这个过程可以被称为“喷涂”。简而言之，将聚原酸酯溶于二氯甲烷、乙酸乙酯或乙醇中，使其在20℃下的粘度约<20cP。由于使用双进料喷嘴(BUCHI B-290迷你喷雾干燥器(Flawil,CH))，内部进料的聚合物浓度≤10% (w/v) 且外部进料的聚合物浓度≤25% (w/v)。微粒以小于10%w/v混悬在聚合物溶液中。当溶剂为二氯甲烷时 T_{in} 为40℃，当溶剂为乙酸乙酯时 T_{in} 为77℃，并且当溶剂为乙醇时 T_{in} 为78℃。通过使用填充有循环冰水的热套来冷却旋风分离器将 T_{out} 保持低于玻璃转化温度(T_g)。 T_{out} 是 T_{in} 、流速、溶剂的性质和抽吸器的函数。将喷嘴的 T_{max} 保持在150℃以下。双进料喷嘴的外部通道和内部通道的最大流速分别为1.2mL/min和2.6mL/min。超声波仪的功率为0.5W到2W；且将抽吸器设定为80%。

[0226] 通过MFI观察到用聚原酸酯(POE)喷涂蛋白质微粒后，朝向更大颗粒的尺寸分布的显著变化(参见图5)。

[0227] 实施例6:蛋白质规格比较

[0228] 将来自复溶的蛋白质微粒(Recon DP)的蛋白质(阿柏西普)与喷雾干燥前的蛋白质(Pre-SD FDS)和制备为液体制剂(EYLEA®DP)的阿柏西普进行比较以确定来自喷雾干燥的任何有害作用。在一个实验中，使这三种制剂中的每一种均经受沉降速度-分析超速离心(SV-AUC)。该方法用于检测和定量蛋白质聚集物(参见Arthus等人,“Detection of protein aggregates by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC):sources of variability and their relative importance,”98(10) J.Pharm.Sci.3522-39,2009)。SV-AUC显示所有批次在HMW物质方面都是相当的(表9)。EYLEA®DP可具有略低的聚集物含量，而复溶的喷雾干燥的阿柏西普可能具有转移到更大的物质的聚集物。但是，鉴于重复样品之间的可变性，那些趋势都不明显显著，并且总体而言，这些结果没有提供明确或有说服力的证据表明这三个样品不相当。

[0229] 表9:通过SV-AUC测定的蛋白质聚集

	单体沉降系数, S(平均值±SD)	推定二聚体 (7.5-8.0 S)% (平均值±SD)	总聚集物%(平均值±SD)
[0230] EYLEA® DP	5.161±0.004	1.3±0.7	1.7±1.2
Pre-SD FDS	5.181±0.014	1.5±0.5	2.2±1.2
Recon DP	5.174±0.002	1.5±0.5	2.3±1.2

[0231] 在另一个实验中，使这三种制剂中的每一种经受尺寸排阻色谱-多角度激光散射(SEC-MALLS)。该方法还用于检测和定量蛋白质聚集物以及错误折叠的蛋白质(参见P.J.Wyatt,“Light scattering and the absolute characterization of macromolecules,”272Anal.Chim.Acta 1-40,1993;Odaka等人,“Ligand-Binding Enhances the Affinity of Dimerization of the Extracellular Domain of the Epidermal Growth Factor Receptor1,”122J.Biochem.116-121,1997;J.S.Philo,“Is

any measurement method optimal for all aggregate sizes and types?”8(3) AAPS J.E564-71,2006)。SEC-MALLS显示所有批次在每种物质的峰面积百分比和计算质量方面相当(参见表10)。

[0232] 表10:通过SEC-MALLS测定的蛋白质聚集

样品	峰值 1(HMW)		峰值 2(主要-天然)	
	MW(kDa)	峰面积%	MW(kDa)	峰面积%
EYLEA® DP	264.2(0.0)	1.0(0.4)	119.6(1.0)	99.0(0.0)
Pre-SD FDS	264.9(3.0)	0.5(0.0)	119.9(0.0)	99.5(0.0)
Recon DP	268.1(6.0)	1.2(0.0)	120.4(1.0)	98.8(0.0)

[0234] 还使阿柏西普的三种制剂经受了毛细管电泳 (CE) -寡糖指纹图谱 (参见Chen等人, “Profiling glycoprotein n-linked oligosaccharide by capillary electrophoresis,”19(15) Electrophoresis 2639-44,1998) 和通过超高效液相色谱-质谱 (UPLC-MS) 进行的胰蛋白酶片段指纹图谱 (参见Sinha等人, “Comparison of LC and LC/MS methods for quantifying N-glycosylation in recombinant IgGs,”19(11) J.Am.Soc.Mass.Spectrom.1643-54,2008) 以评估糖基化和其它翻译后修饰以及一级序列。CE-寡糖指纹图谱显示所有批次都是相当的 (表11)。

[0235] 表11:翻译后修饰

翻译后修饰		EYLEA® DP	Pre-SD FDS	Recon DP
具有和/或不具有 Lys ⁴³² 的 C 末端肽	没有 Lys ⁴³²	96.2%	96.4%	96.5%
	具有 Lys ⁴³²	3.8%	3.6%	3.5%
Asn ⁸⁴ -Gly 基序处的脱酰胺 (isoAsp) 水平	ASN ⁸⁴	78.9%	79.5%	79.3%
	isoAsp ⁸⁴	21.1%	20.5%	20.7%
Met ¹⁰ 处的氧化水平	Met ¹⁰	97.6%	97.5%	97.0%
	Met(O) ¹⁰	2.4%	2.5%	3.0%
Met ¹⁹² 处的氧化水平	Met ¹⁹²	96.6%	96.6%	96.4%
	Met(O) ¹⁹²	3.4%	3.4%	3.6%
Met ²³⁷ 处的氧化水平	Met ²³⁷	97.2%	97.2%	97.2%
	Met(O) ²³⁷	2.8%	2.8%	2.8%
DYLTHR 肽水平(与 NR1 带有关)	⁹¹ DYLTHR ⁹⁶	0.29%	0.34%	0.33%
Arg ⁵ 处的 N-末端肽糖基化	经修饰的 N-末端	9.2%	9.0%	9.0%
	糖基化	64.3%	63.8%	64.6%
	非糖基化	35.7%	36.2%	35.4%

[0238] 三种阿柏西普样品在还原和非还原条件下的肽谱图色谱在视觉上是相当的。在喷雾干燥的样品中没有观察到对应于突变序列的独特或显著的峰。所有的翻译后修饰均存在于所有样品中：C-末端赖氨酸去除、天冬酰胺脱酰胺、蛋氨酸氧化和天冬酰胺糖基化。所有三个样品都显示了5个N-连接的糖基化位点处的位点特异性糖基化图谱。所有三种样品中二硫化物-键合肽的模式符合阿柏西普预期的二硫化物键合模式。在所分析的三个样品中未还原的肽图中未鉴定出显著水平的混杂或游离的含半胱氨酸的肽。喷雾干燥的阿柏西普的肽图谱分析符合 EYLEA®DP 参考标准品。

[0239] 实施例7:水分对经配制的药物粉末中蛋白质稳定性的影响

[0240] 根据实施例1中呈现的方法制备三种不同蛋白质的喷雾干燥制剂。三种蛋白质中的每一种的四种经配制的粉末被制备为具有不同量的水分。三种蛋白质是IgG1、IgG4和捕获剂分子(阿柏西普)。每种阿柏西普粉末含有83.8% (w/w) 阿柏西普、2.1% (w/w) 磷酸盐和14.1% (w/w) 蔗糖,其含水量范围<0.5%至>6%。每种IgG1粉末含有80.9% (w/w) IgG1、1.5% (w/w) 组氨酸、16.4% (w/w) 蔗糖和0.2% 聚山梨醇酯80,其含水量范围为<0.5%至>6%。每种IgG4粉末含有44.5% (w/w) IgG1、0.4% (w/w) 乙酸盐、56.3% (w/w) 蔗糖和0.4% 聚山梨醇酯20,其含水量范围为<0.5%至>6%。

[0241] 将粉末在50℃下储存长达6周。在三周、一个月和六周时获得样品。将样品复溶,并通过SE-UPLC评估蛋白质的高分子量物质的变化。基于从复溶样品获得的HMW值计算聚集速率。结果呈现于表12中。

[0242] 表12:经配制的药物粉末中的水分对蛋白质稳定性的影响

[0243]	分子	水分含量(% 水 w/w)	在 50℃下的聚集 速率
[0244]	IgG4	0.36	(% HMW/mo ^{-1/2}) 1.08
		0.80	1.08
		3.71	1.38
		12.94	11.62
	IgG1	0.01	12.60
		0.88	11.07
		5.31	8.74
		13.06	20.84
	阿普西柏	0.01	13.29
		0.92	12.47
		5.45	10.99
		14.12	27.20

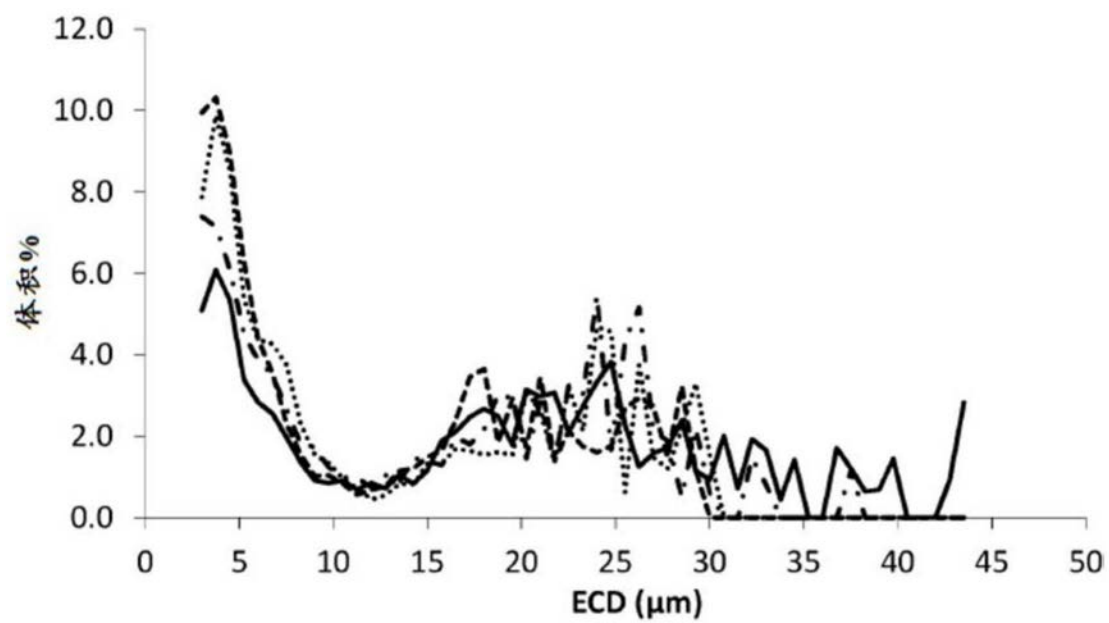


图1

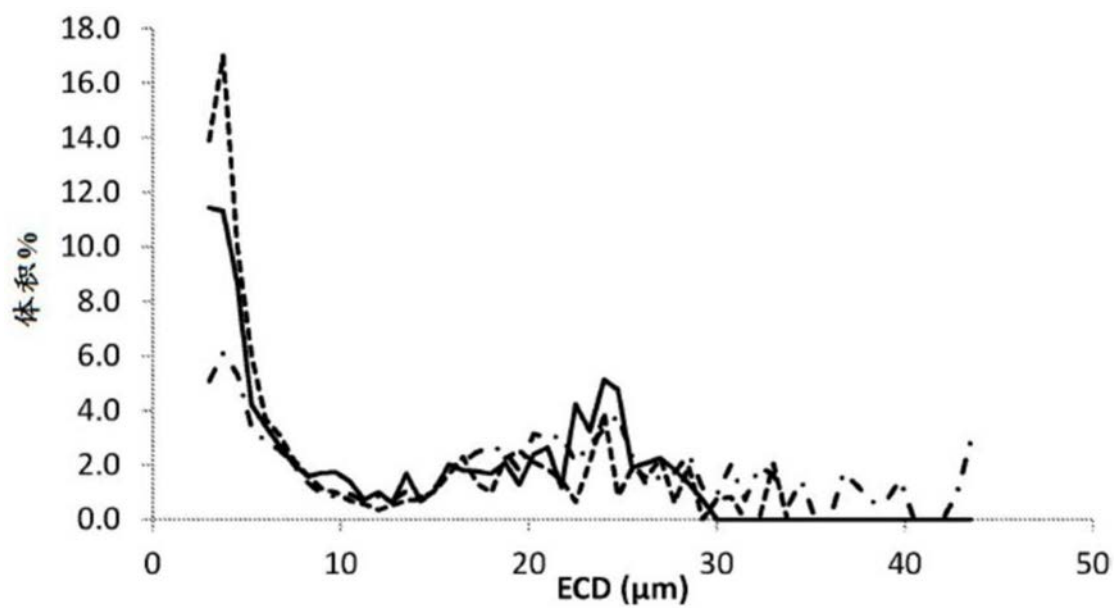


图2

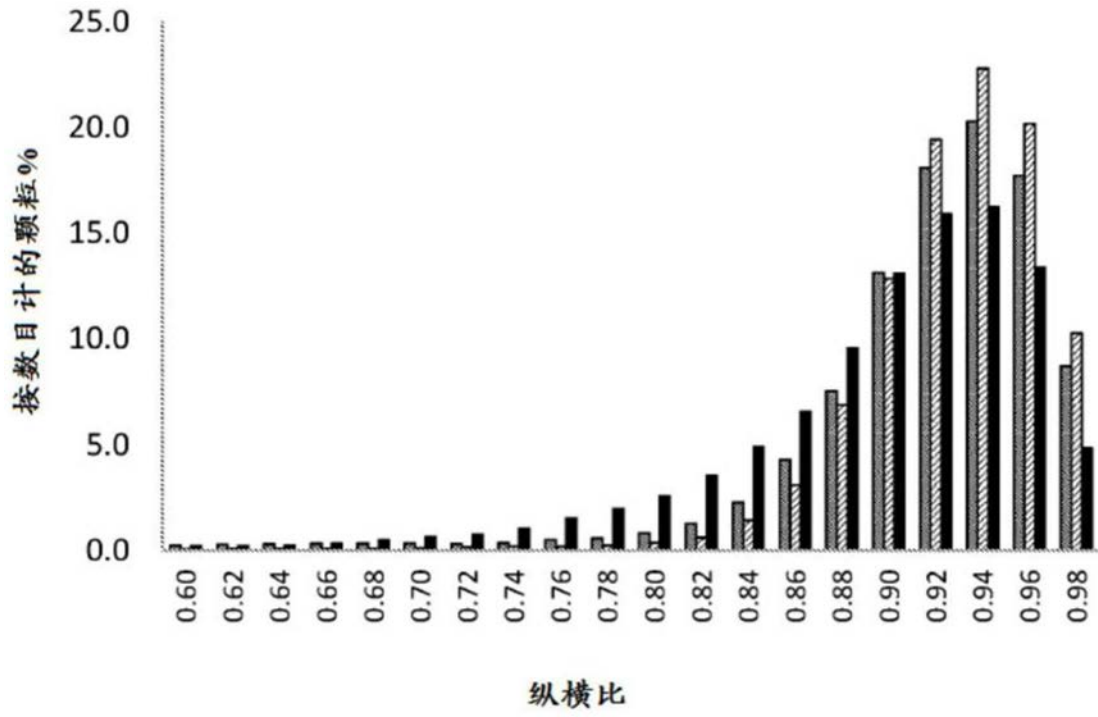


图3

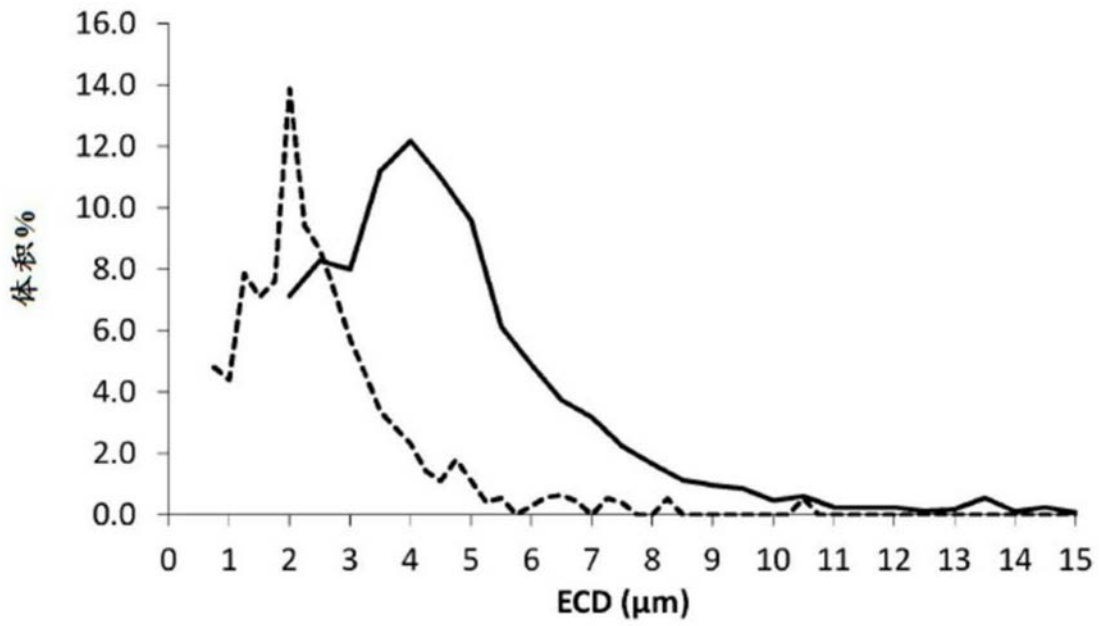


图4

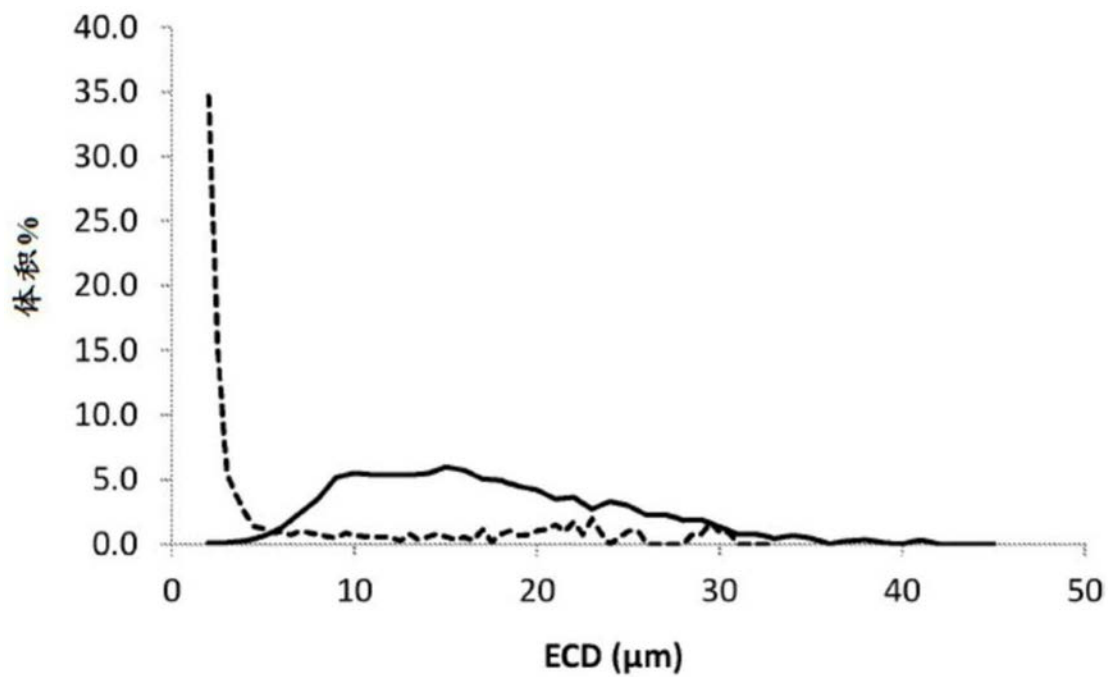


图5

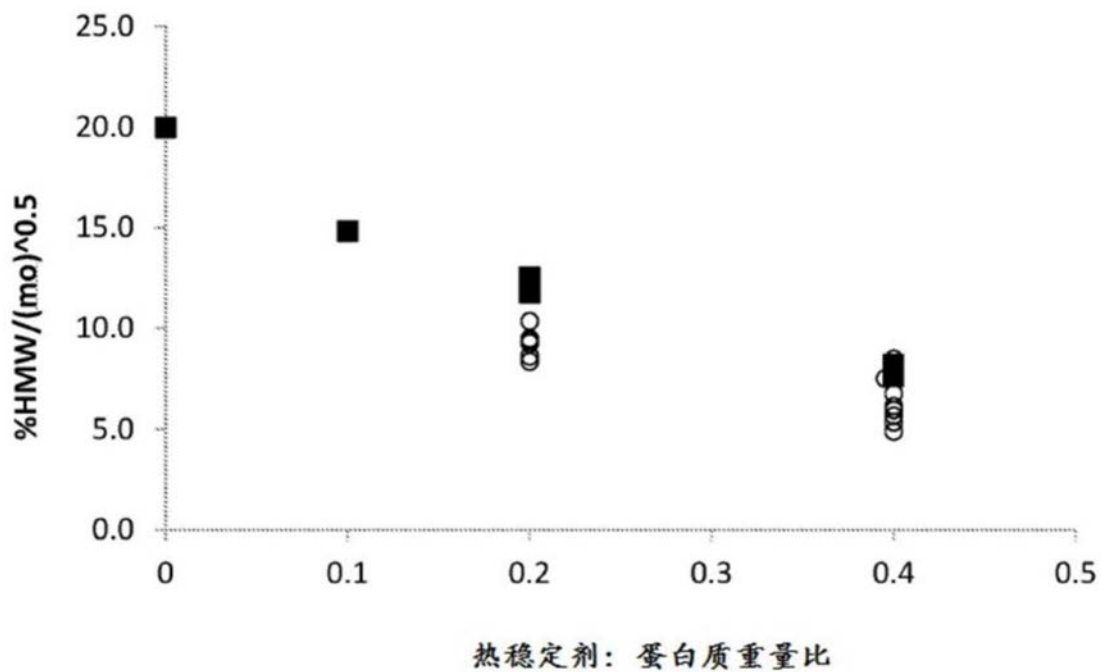


图6A

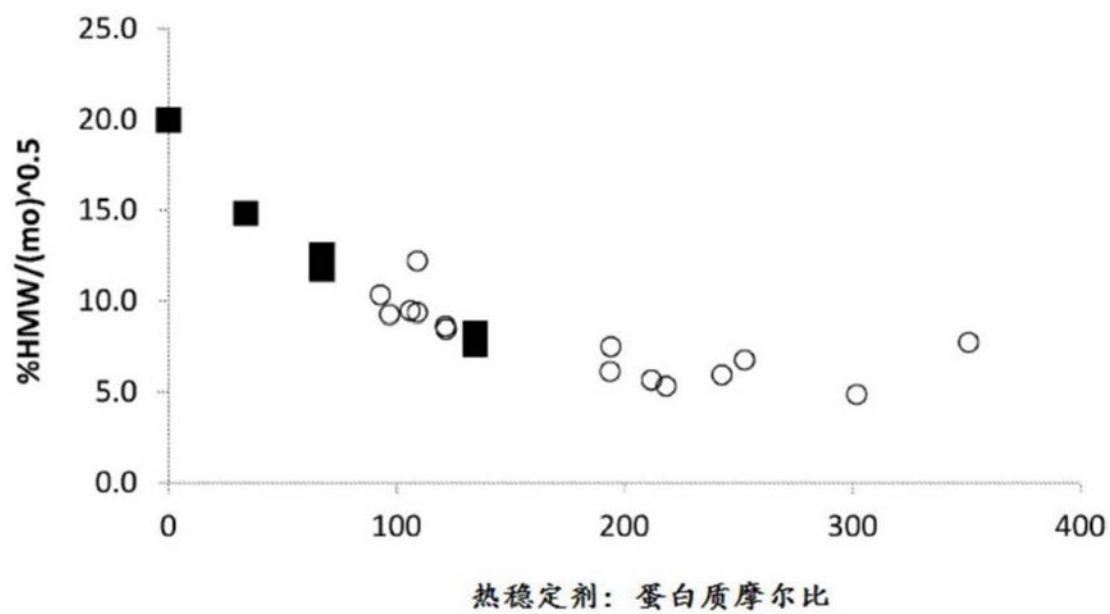


图6B