

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500304
(P2005-500304A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 16/18
A61K 39/395
A61K 48/00
A61K 49/00
A61P 9/10

F 1

C07K 16/18
A61K 39/395
A61K 39/395
A61K 48/00
A61K 49/00

テーマコード(参考)

4 C084
4 C085
4 H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 246 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-506470 (P2003-506470)
(86) (22) 出願日 平成14年6月21日 (2002.6.21)
(85) 翻訳文提出日 平成15年12月18日 (2003.12.18)
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/019870
(87) 國際公開番号 WO2003/000014
(87) 國際公開日 平成15年1月3日 (2003.1.3)
(31) 優先権主張番号 60/299,989
(32) 優先日 平成13年6月21日 (2001.6.21)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 500498730
アルタスバイオロジックス インコーポ
レイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
139-4211, ケンブリッジ, プ
トナム アベニュー 625
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

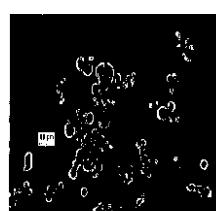
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】球状タンパク質粒子およびそれらの作製方法および使用方法

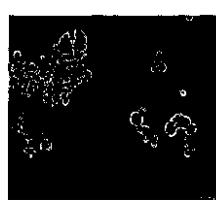
(57) 【要約】

本発明は、生物学的に活性なタンパク質の、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPP、またはこのようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを含む組成物(処方物も含む)に関する。より具体的には、単独での使用のためかあるいは乾燥組成物またはスラリー組成物中での、高濃度である生物学的に活性なタンパク質の、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶SPPの產生のための方法、および安定化したSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの調製のための方法が提供される。本発明はまた、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを使用する生物学的に活性なタンパク質の安定化、貯蔵および送達のための方法に関する。本発明はさらに、生物医学的用途のための、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPあるいはこれらを含む組成物または処方物を使用する方法に関する。

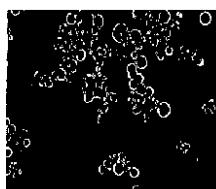
MORPHOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODY SPPs



A. Infliximab (Remicade™) SPPs



B. Rituximab (Rituxan™) SPPs



C. Trastuzumab (Herceptin™) SPPs

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

球状タンパク質粒子。

【請求項 2】

球状ナノクリスタル複合粒子である、請求項 1 に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 3】

前記タンパク質が、抗体または該抗体の単鎖 Fv フラグメントである、請求項 1、または 2 に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 4】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 300 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 10 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 5】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 200 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 6】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 100 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 7】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 10 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 8】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 5 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 9】

直径にして約 0.04 ミクロンから約 1 ミクロンの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 10】

直径にして約 40 ナノメートルから約 999 ナノメートルの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 11】

直径にして約 40 ナノメートルから約 499 ナノメートルの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 12】

直径にして約 250 ミクロンを超えて約 300 ミクロンまでの範囲の粒径を有している、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 13】

直径にして約 1 μm ~ 約 300 μm であり、かつ約 40 nm ~ 約 999 nm の直径を有しているタンパク質ナノクリスタルを含む、請求項 2 に記載の球状ナノクリスタル複合粒子。

【請求項 14】

直径にして約 1 μm ~ 約 300 μm であり、かつ約 40 nm ~ 約 499 nm の直径を有しているタンパク質ナノクリスタルを含む、請求項 2 に記載の球状ナノクリスタル複合粒子。

【請求項 15】

請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、前記タンパク質が該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物のコンフォメーションと同じであるコンフォメーションを有しており、これは、該ネイティブの可溶性である対応物に特異的に結合する、モノクローナル抗体を使用する E L I S A によって示される、球状タンパク質粒子。

【請求項 16】

請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、前記タンパク質が該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の シート構造要素か 50

ら約20%未満異なるシート構造要素を有しており、かつ該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物のヘリックス構造要素から約20%未満異なるヘリックス構造要素を有しており、これは、FTIRまたは円二色性(CD)分光法によって示される、球状タンパク質粒子。

【請求項17】

請求項16に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、前記タンパク質が該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物のシート構造要素から約20%未満異なるシート構造要素を有しており、これは、FTIRによって示されるような、該ネイティブタンパク質の可溶性である対応物と比較する相関スペクトルによって示される、球状タンパク質粒子。

10

【請求項18】

請求項16に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、前記タンパク質が、同一条件下保存の後にそのネイティブの可溶性物と比較して、約4～約50で、4日から180日間の保存の後にそのヘリックス構造要素の約20%未満を失っている、球状タンパク質粒子。

【請求項19】

請求項16項に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、該タンパク質は、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物のシート構造要素から約20%未満で異なるシート構造要素を有しており、かつ該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物のヘリックス構造要素の約20%未満を失っており、これは、円二色性(CD)分光法によって示される、球状タンパク質粒子。

20

【請求項20】

請求項1、2、または3のいずれか1項に記載の球状タンパク質粒子であって、ここで、前記タンパク質が生物学的に活性なコンフォメーションを有しており、これは、そのネイティブで可溶性である対応物の生物学的活性と溶解している球状タンパク質粒子のタンパク質成分の生物学的活性とを比較することによって示される、球状タンパク質粒子。

【請求項21】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約100%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

30

【請求項22】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約90%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項23】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約80%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項24】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約70%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

40

【請求項25】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約60%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項26】

前記タンパク質成分が、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約50%の生物学的活性を有する、請求項20に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項27】

前記抗体または前記抗体フラグメントが、該タンパク質のネイティブの可溶性である対応物の約50%を超えて約100%までの生物学的活性を有し、これは生物免疫アッセイによって決定付けられる、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項28】

前記生物免疫アッセイが直接的細胞傷害性生物免疫アッセイである、請求項27に記載の

50

球状タンパク質粒子。

【請求項 29】

前記生物免疫アッセイが補体依存性細胞傷害性(CDC)生物免疫アッセイである、請求項27に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 30】

前記生物免疫アッセイが抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)生物免疫アッセイである、請求項27に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 31】

前記抗体が治療用抗体である、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 32】

請求項3に記載の球状タンパク質粒子であって、前記抗体が、以下：

IgG抗体、IgM抗体、IgA抗体、IgD抗体、IgE抗体、および血清IgA(sIgA)抗体ならびにサブクラスのIgG1抗体、IgG2抗体、IgG3抗体およびIgG4抗体、IgM1抗体およびIgM2抗体、ならびにIgA1抗体およびIgA2抗体からなる群より選択される、球状タンパク質粒子。

【請求項 33】

前記抗体が該抗体の可溶性対応物よりもインビボでの長い半減期を有している、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 34】

前記抗体がポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 35】

前記抗体がRituximab、Infliximab、Trastuzumab、およびEntanerceptからなる群より選択される、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 36】

前記抗体が、Abciximab、Palivizumab、Murumonab-CD3、Gemtuzumab、Basiliximab、DaclizumabおよびZevalinからなる群より選択される、請求項3に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 37】

請求項3に記載の球状タンパク質粒子であって、前記抗体が、以下：

心臓血管疾患を処置するための抗体、呼吸系疾患を処置するための抗体、組織移植拒絶反応を処置するための抗体、臓器移植拒絶反応を処置するための抗体、癌を処置するための抗体、炎症疾患を処置するための抗体、および放射線免疫療法において使用される抗体からなる群より選択される、球状タンパク質粒子。

【請求項 38】

標識されている、請求項1、2または3のいずれかに記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 39】

請求項38に記載の球状タンパク質粒子であって、

以下：

放射性標識、酵素標識、毒素、磁気試薬、および薬物結合体、から選択される標識で標識される、球状タンパク質粒子。

【請求項 40】

請求項3に記載の球状タンパク質粒子であって、前記抗体が以下：

抗TNF抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD25抗体、抗CD33抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗HBV抗体、抗HAV抗体、抗HCV抗体、抗GPIIb/IIIaレセプター抗体、抗RSV抗体、抗HIV抗体、抗HSV抗体、および抗EBV抗体からなる群より選択される、球状タンパク質粒子。

【請求項 41】

乾燥した球状タンパク質粒子である、請求項1、2、または3のいずれか1項に記載の球

10

20

30

40

50

状タンパク質粒子。

【請求項 4 2】

キャリアを含まない薬学的制御放出球状タンパク質粒子である、請求項 1、2、または 3 のいずれか 1 項に記載の球状タンパク質粒子。

【請求項 4 3】

請求項 1 または 2 の記載の球状タンパク質粒子であって、前記タンパク質は、以下：酵素、タンパク質性ホルモン、ウイルス、ウイルスタンパク質、抗体、抗体フラグメント、レセプターおよびペプチド

からなる群より選択される、球状タンパク質粒子。

【請求項 4 4】

請求項 3 に記載の球状タンパク質粒子であって、前記抗体が以下：

キメラ抗体、ヒト化抗体、非グリコシル化抗体、二特異性抗体、ヒト抗体およびマウス抗体

からなる群より選択される、球状タンパク質粒子。

【請求項 4 5】

球状核酸粒子。

【請求項 4 6】

前記核酸が哺乳動物の予防接種に使用される、請求項 4 5 に記載の球状核酸粒子。

【請求項 4 7】

前記核酸が遺伝子である、請求項 4 5 に記載の球状核酸粒子。

【請求項 4 8】

組成物であって、該組成物は、以下：

(a) 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載の球状タンパク質粒子、および

(b) 少なくとも 1 つの成分

を含む、組成物。

【請求項 4 9】

前記タンパク質を放出し得る、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

約 1 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

約 10 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

約 20 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

約 50 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

約 100 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

約 120 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

約 200 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

約 400 mg / ml を超える球状タンパク質粒子濃度を有する、請求項 4 8 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 5 8】

前記成分がポリマー性キャリアである、請求項4 8に記載の組成物。

【請求項 5 9】

前記ポリマー性キャリアが生分解性ポリマーまたは生体適合性ポリマーである、請求項5 8に記載の組成物。

【請求項 6 0】

請求項5 8に記載の組成物であって、前記ポリマー性キャリアが以下：

ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、
ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-c o -グリ
コール酸)すなわちPLGA、ポリ(b -ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクト
ン)、ポリ(ジオキサン)；ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ヒドロキシプロピル)
メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、
ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸アルキルビニルエ
ーテルコポリマー、ブルロニックポリオール、アルブミン、アルギメント、セルロースお
よびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴサッ
カリド、グリカミノグリカン、硫酸化ポリサッカリド、それらのブレンドならびにそれ
らのコポリマー

からなる群のうちの1以上から選択されたポリマーである、組成物。

【請求項 6 1】

前記ポリマー性キャリアがポリ(乳酸-c o -グリコール酸)である、請求項5 8に記載
の組成物。

【請求項 6 2】

前記ポリマー性キャリアがポリ(ビニルアルコール)で乳化されている、請求項5 8に記
載の組成物。

【請求項 6 3】

前記ポリマー性キャリアがコポリマーである、請求項5 8に記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記成分がアルブミンである、請求項4 8に記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記タンパク質がインタクトな抗体または該抗体の単鎖F vフラグメントである、請求項
4 8に記載の組成物。

【請求項 6 6】

前記抗体が治療用抗体である、請求項4 8に記載の組成物。

【請求項 6 7】

請求項4 8の記載の組成物であって、前記成分が、以下：

スクロース、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル- - -シクロ
デキストリン、メトキシポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコール
からなる群より選択される、組成物。

【請求項 6 8】

哺乳動物を処置するための方法であって、該方法は、以下：

請求項1、2、または3のいずれかに記載の球状タンパク質粒子を含む有効量の溶液または
有効量の請求項4 8に記載の組成物を該哺乳動物に投与する工程
を包含する、方法。

【請求項 6 9】

前記有効量が治療的有効量または薬学的有効量である、請求項6 8に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記有効量が診断的有効量である、請求項6 8に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記球状タンパク質粒子または前記組成物が、以下：

経口投与、筋内投与、静脈内投与、肺吸入投与、非経口投与、経皮投与、エアロゾル送達

10

20

30

40

50

投与、無針注射投与ならびに皮下注射投与および皮下無針注射投与からなる群より選択される経路によって投与される、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 2】

請求項 6 8 に記載の方法であって、前記溶液は、前記球状タンパク質粒子の懸濁物または前記組成物の懸濁物を含み、ここで、溶液中の該タンパク質の濃度は少なくとも約 10 mg / ml である、方法。

【請求項 7 3】

請求項 6 8 に記載の方法であって、前記溶液は、前記球状タンパク質粒子の懸濁物または前記組成物の懸濁物を含み、ここで、溶液中の該タンパク質の濃度は少なくとも約 50 mg / ml である、方法。 10

【請求項 7 4】

請求項 6 8 に記載の方法であって、前記溶液は、前記球状タンパク質粒子の懸濁物または前記組成物の懸濁物を含み、ここで、溶液中の該タンパク質の濃度は少なくとも約 100 mg / ml である、方法。

【請求項 7 5】

請求項 6 8 に記載の方法であって、前記溶液は、前記球状タンパク質粒子の懸濁物または前記組成物の懸濁物を含み、ここで、溶液中の該タンパク質の濃度は少なくとも約 200 mg / ml である、方法。

【請求項 7 6】

請求項 6 8 に記載の方法であって、前記溶液は、前記球状タンパク質粒子の懸濁物または前記組成物の懸濁物を含み、ここで、溶液中の該タンパク質の濃度は少なくとも約 400 mg / ml である、方法。 20

【請求項 7 7】

タンパク質のアフィニティーマトリックス精製のための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 請求項 3 に記載の抗体または抗体フラグメントを含む球状タンパク質粒子と結合緩衝液とを混合して球状タンパク質粒子 / 緩衝液混合物を形成する工程であって、ここで、該抗体または該抗体フラグメントは精製されるタンパク質に対する親和性を有する、工程；

(b) 該精製されるタンパク質を含むタンパク質溶液を該球状タンパク質粒子 / 緩衝液混合物に添加して、タンパク質溶液 / 球状タンパク質粒子 / 緩衝液混合物を形成する工程；
(c) 該抗体または該抗体フラグメントへの該タンパク質の結合を可能にするのに十分な時間および温度で、該タンパク質溶液 / 球状タンパク質粒子 / 緩衝液混合物をインキュベートする工程； 30

(d) 洗浄緩衝液で該混合物を洗浄する工程；および

(e) 溶出緩衝液で該タンパク質を溶出する工程
を包含する、方法。

【請求項 7 8】

サンプル中の抗原のインピトロ検出のための診断キットであって、該キットは、以下：

(a) 請求項 3 に記載の抗体または抗体フラグメントを含む球状タンパク質粒子であって、該抗体または該抗体フラグメントは、該抗原に特異的に結合し得る、抗体または抗体フラグメント；および 40

(b) 該サンプル中の任意の抗原に対する該抗体または該抗体フラグメントの結合を検出するための 1 以上の試薬；
を備える、キット。

【請求項 7 9】

前記抗原がウイルス抗原である、請求項 7 8 に記載の診断キット。

【請求項 8 0】

請求項 7 9 に記載の診断キットであって、前記ウイルス抗原は以下：

HIV - 1 抗原、HIV - 2 抗原、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV) 抗原、B 型肝 50

炎ウイルス(H B V)抗原、C型肝炎ウイルス(H C V)抗原、インフルエンザウイルス抗原、単純ヘルペス1型(H S V - 1)抗原、単純ヘルペス2型(H S V - 2)抗原、エピスタイン・バーウィルス(E B V)抗原、水痘・帯状疱疹ウイルス抗原、サイトメガロウイルス(C M V)抗原、ライノウイルス抗原、アデノウイルス抗原、ヒト乳頭腫ウイルス(H P V)抗原、ポリオウイルス抗原、コクサッキーウイルス抗原、および口蹄疫ウイルス(F M D V)抗原

からなる群より選択される、診断キット。

【請求項 8 1】

前記抗体または前記抗体フラグメントが標識されている、請求項 7 8 に記載の診断キット。
10

【請求項 8 2】

サンプル中の抗原の存在を検出するためのインビトロ診断方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項 3 に記載の抗体または抗体フラグメントが該サンプル中の任意の抗原に結合することを可能にする条件下で、該抗体または該抗体フラグメントを含む球状タンパク質粒子と該サンプルを接触する工程であって、ここで、該抗体または該抗体フラグメントは、該抗原に特異的に結合し得る、工程；および

(b) 該サンプル中の任意の抗原に対する該抗体または抗体フラグメントの結合を検出する工程；

を包含する、方法。
20

【請求項 8 3】

前記抗原がウイルス抗原である、請求項 8 2 に記載の診断方法。

【請求項 8 4】

請求項 8 3 に記載の診断方法であって、前記ウイルス抗原は、以下：

H I V - 1 抗原、H I V - 2 抗原、ヒトT細胞白血病ウイルス(H T L V)抗原、B型肝炎ウイルス(H B V)抗原、C型肝炎ウイルス(H C V)抗原、インフルエンザウイルス抗原、単純ヘルペス1型(H S V - 1)抗原、単純ヘルペス2型(H S V - 2)抗原、エピスタイン・バーウィルス(E B V)抗原、水痘・帯状疱疹ウイルス抗原、サイトメガロウイルス(C M V)抗原、ライノウイルス抗原、アデノウイルス抗原、ヒト乳頭腫ウイルス(H P V)抗原、ポリオウイルス抗原、コクサッキーウイルス抗原、および口蹄疫ウイルス(F M D V)抗原
30

からなる群より選択される、診断方法。

【請求項 8 5】

前記抗体または前記抗体フラグメントが標識されている、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 6】

サンプル中の抗体のインビトロ検出のための診断キットであって、該キットは、以下：

(a) 請求項 1 または 2 に記載の球状タンパク質粒子であって、前記タンパク質は該抗体に特異的に結合し得る抗原である、球状タンパク質粒子；および

(b) 該サンプル中の任意の抗体に対する該抗原の結合を検出するための 1 以上の試薬を備える、キット。
40

【請求項 8 7】

前記抗体がウイルス抗原に特異的結合する抗体である、請求項 8 6 に記載の診断キット。

【請求項 8 8】

請求項 8 7 に記載の診断キットであって、前記ウイルス抗原が、以下：

H I V - 1 抗原、H I V - 2 抗原、ヒトT細胞白血病ウイルス(H T L V)抗原、B型肝炎ウイルス(H B V)抗原、C型肝炎ウイルス(H C V)抗原、インフルエンザウイルス抗原、単純ヘルペス1型(H S V - 1)抗原、単純ヘルペス2型(H S V - 2)抗原、エピスタイン・バーウィルス(E B V)抗原、水痘・帯状疱疹ウイルス抗原、サイトメガロウイルス(C M V)抗原、ライノウイルス抗原、アデノウイルス抗原、ヒト乳頭腫ウイルス(H P V)抗原、ポリオウイルス抗原、コクサッキーウイルス抗原、および口蹄疫ウイ
50

ルス(F M D V)抗原

からなる群より選択される、診断キット。

【請求項 8 9】

前記抗原が標識されている、請求項 8 6 に記載の診断キット。

【請求項 9 0】

サンプル中の抗体の存在を検出するためのインビトロ診断方法であって、該方法は、以下：

(a) 前記抗原が該サンプル中の任意の抗体に結合することを可能にする条件下で、請求項 1 または 2 に記載の球状タンパク質粒子と該サンプルを接触する工程であって、ここで、前記タンパク質は、該抗体に特異的に結合し得る抗原である、工程；および

(b) 該サンプル中の任意の抗体に対する該抗原の結合を検出する工程；
を包含する、診断方法。

【請求項 9 1】

前記抗体が、ウイルス抗原に特異的に結合する抗体である、請求項 9 0 に記載の診断方法。

【請求項 9 2】

請求項 9 1 に記載の診断方法であって、前記ウイルス抗原が、以下：

H I V - 1 抗原、H I V - 2 抗原、ヒトT細胞白血病ウイルス(H T L V)抗原、B型肝炎ウイルス(H B V)抗原、C型肝炎ウイルス(H C V)抗原、インフルエンザウイルス抗原、単純ヘルペス 1 型(H S V - 1)抗原、単純ヘルペス 2 型(H S V - 2)抗原、エピスタイン・バーワイルス(E B V)抗原、水痘-帯状疱疹ウイルス抗原、サイトメガロウイルス(C M V)抗原、ライノウイルス抗原、アデノウイルス抗原、ヒト乳頭腫ウイルス(H P V)抗原、ポリオウイルス抗原、コクサッキーウイルス抗原、および口蹄疫ウイルス(F M D V)抗原

からなる群より選択される、診断方法。

【請求項 9 3】

前記抗原が標識されている、請求項 9 0 に記載の診断方法。

【請求項 9 4】

哺乳動物中の抗原の存在を検出するためのインビオ診断方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 請求項 3 に記載の抗体または抗体フラグメントが該サンプル中の任意の抗原に結合することを可能にする条件下で、該抗体または抗体フラグメントを含む診断的有効量の球状タンパク質を該哺乳動物に投与する工程であって、ここで、該抗体または抗体フラグメントは該抗原に特異的に結合し得る、工程；および

(b) 該サンプル中の任意の抗原に対する該抗体または抗体フラグメントの結合を検出する工程；

を包含する、方法。

【請求項 9 5】

前記抗体または前記抗体フラグメントが標識されている、請求項 9 4 に記載の診断方法。

【請求項 9 6】

サンプル中の抗体の存在を検出するためのインビオ診断方法であって、該方法は、以下：

(a) 該抗原が該サンプル中の任意の抗体に結合することを可能にする条件下で、診断的有効量の請求項 1 または 2 のいずれかに記載の球状タンパク質粒子とを該哺乳動物に投与する工程であって、ここで、該タンパク質は、該抗体に特異的に結合し得る抗原である、工程；および

(b) 該サンプル中の任意の抗体に対する該抗原の結合を検出する工程；
を包含する、診断方法。

【請求項 9 7】

前記抗原が標識されている、請求項 9 6 に記載の診断方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】**【0001】**

(発明の技術分野)

本発明は、球状タンパク質粒子（「SPP」）、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、それらを生成するための方法ならびにそれらを使用するための方法および組成物（処方物を含む）に関する。

【0002】

より詳細には、本発明はさらに、ヒトおよび動物への生物学的送達のためのSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPの使用方法に関する。より具体的には、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPを使用して、生物学的に活性な薬学的タンパク質の送達のための代替の投薬／送達形態（例えば、エアロゾル、針なし（needle less）注射）を提供し得る。10

【0003】

本発明はさらに、生物医学的適用のためのSPP、球状ナノクリスタル複合粒子あるいは結晶性SPP、またはこれらを含有する組成物（処方物を含む）（より詳細には、高濃度のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの組成物（処方物を含む）を含む）の使用する方法に関し、これらは、被験体が必要とする時間および場所で、被験体に小さい体積で多量のタンパク質を送達するのに有用である。本発明の1つの実施形態に従って、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、被験体が必要とする時間および場所で、被験体に生物学的に活性なタンパク質をゆっくりと放出し得るキャリアを含まない送達系として使用される。本発明の代替の実施形態に従って、薬学的成分または賦形剤を、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPに添加し、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを含有する組成物を作製し得る。本発明に従う組成物の1つの実施形態は、処方物である。処方物は、生体適合性ポリマー・キャリアにカプセル化されるSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを含む。別の実施形態において、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPならびにそれらを含む組成物および処方物は、生物医学的適用（治療用タンパク質およびワクチンの送達を含む）のために使用される。20

【0004】

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの安定化した組成物（処方物を含む）を調製する方法、および生物医学的適用（治療用タンパク質およびワクチンの送達を含む）のための、このようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの使用方法もまた提供される。30

【0005】

タンパク質が植物、山羊乳、牛乳、細胞培養物、組織培養物および卵において発現する場合、このようなタンパク質の複合混合物由来の目的の所望のタンパク質を抽出するために、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPを使用する方法もまた提供される。

【背景技術】**【0006】**

(発明の背景)

タンパク質薬物は、それらの非常に乏しいバイオアベイラビリティーのために、一般的に、非経口的投与（すなわち、注射または注入）のために処方される。タンパク質薬物の非経口的投与は、通常、医者、またはある場合、病院への訪問を必要とする。結果として、タンパク質薬物の非経口的投与を必要とする患者に対する医療は、しばしば費用が高く、そして時間がかかる。さらに、患者のコンプライアンスは、しばしば問題であり、特に長期の処置を必要とする患者のコンプライアンスは問題である。

【0007】

この問題に対処するために、針なし注射技術（例えば、針なし皮下投与）ならびに代替の薬物投薬および送達の方法および形態（例えば、乾燥パウダー吸入、皮膚エレクトロポレ

10

20

30

40

50

ーションおよび徐放性薬物または制御放出薬物)が利用される。

【0008】

針なし注射技術ならびに代替の薬物投薬および送達の方法および形態における使用のために、タンパク質薬物は、必要な安定性を達成するために、固体粒子として製造されなければならない。多くの適用のために、使用されるべきタンパク質粒子は、十分に定義された制限された大きさおよび形態学を有さなければならない。例えば、吸入を介するタンパク質薬物の送達のために、作用の主要な部位(肺胞)に到達される場合、吸入されるべきタンパク質粒子の直径は、約2~3ミクロンでなければならない。多数の方法(噴霧乾燥、凍結乾燥およびジェットミルが挙げられる)が、ミクロンサイズのタンパク質粒子を調製するために利用される。これらの方法は、典型的に熱および機械的応力によってタンパク質を変性するので、これらの方法は問題である。従って、タンパク質の生物学的活性を失うことなく、ミクロンサイズまたはナノメーターサイズのタンパク質粒子を調製する代替の方法が必要である。本発明に従うSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、この問題ならびに以下に議論される問題を解決する。

【0009】

Ruthら、Acta Crystallographica D56:524-28(2000)(「Ruth」)は、結晶化のハングドロップ(hanging drop)方法を使用して作製された-L-イズロニダーゼ半結晶性スフェルライトに関する。pH3.0~8.5で結晶化溶液がカルシウム塩および亜鉛塩の存在下で使用された場合、-L-イズロニダーゼスフェルライトが、形成した。しかし、スフェルライトを形成するプロセスの間、-L-イズロニダーゼタンパク質の部分的変性または展開におそらく起因して、-L-イズロニダーゼタンパク質は配座変化を起こした。本発明の方法は、配座のあらゆる変化または生物学的活性の損失を生じることを避ける。

【0010】

米国特許番号6,063,910('910特許)は、超臨界流体沈殿によるタンパク質微粒子の調製方法に関する。この方法は、本発明によって克服される多数の欠点を有する。'910特許に開示される方法は、90%有機溶媒中への目的のタンパク質の懸濁を必要とし、これは、多数のタンパク質に対して適切ではない。従って、'910特許に開示される方法は、本発明の方法とは異なり、沈殿物の粒子を生じ、いくつかの実施形態において、本質的には、結晶性であるSPPを生じ得る。さらに、'910特許の方法から得られる粒子は、5ミクロン未満の直径を有するが、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、直径が約0.04~約200ミクロンおよびおそらくより大きな範囲にある粒子を形成する。

【0011】

タンパク質粒子を調製するさらなる方法はまた、例えば、Bustami R.T.ら、Pharmaceutical Research 17:1360-66(2000)(「Bustami」)に開示される。Bustamiは、高圧改変二酸化炭素を使用するタンパク質の球状微粒子を形成する方法を言及する。Bustamiの方法を使用して形成された粒子は、たった約0.1~0.5ミクロンの直径であるが、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを生成する方法は、直径が約0.04~約300ミクロンの範囲である粒子をもたらす。さらに、Bustamiにおいて、微粒子中に形成されたタンパク質は、結果としてそれらの生物学的活性の60%(組換えヒトデオキシリボヌクレアーゼ(rhDNase)に対して)までを損失した。本発明の方法を使用して、生物学的活性の損失は、予想されない。最後に、Bustamiの方法は、明らかにタンパク質凝集を誘導するが、本発明の方法は誘導しない。

【0012】

原則として、乾燥のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPはまた、凍結乾燥によって調製され得る。例えば、Morita T.ら、Pharmaceutical Research 17:1367-73(2000)(「Morita」)を参照のこと。Moritaは、タンパク質-ポリエチレングリコール(PEG)水性混合

物の凍結乾燥によって球状の微細なタンパク質微粒子を形成する方法を言及する。Moritaの方法は、相分離（本明細書中の方法とは異なる）、続く凍結乾燥に依存して、2~3ミクロンの直径を有する球を得る。本発明の方法は、遠心分離、濾過または凍結乾燥によって単離され得る異なる粒子の形態をもたらす。また、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、直径が約0.04~約300ミクロンの範囲である粒子を形成する。さらに、Moritaに開示される方法は、以前の工程に使用されたPEGを除去するために、さらなる有機溶媒（例えば、塩化メチレン）（上記のように、多数のタンパク質に対して適切でない）を必要とする。さらに、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、これらの形態に使用される母液外および他の溶媒（例えば、水性イソプロピルアルコール）への移動に対して適切である。また、Moritaに開示される方法は、PEGの使用を必要とし、これは使用されるタンパク質を安定化してもよいし、安定化しなくてもよい。対照的に、本発明の方法は、PEG以外の試薬の使用を可能にし、このPEGは目的のタンパク質をより安定化し得る。例えば、本発明の方法は、一般的にタンパク質を安定化し、そしてMoritaの開示される方法において使用され得ない硫酸アンモニウムを使用し得る。

10

【0013】

Moritaの方法の別の限定は、開示される技術が材料の急速な冷却に関し、そして安定な生成物を凍結することのみに適用され得ることである。水溶液を始めに、-40~-50の間に凍結する。次いで、この氷を減圧下で除去する。氷形成は、通常タンパク質結晶格子にとって破壊的であり、タンパク質分子を不安定化し、そして時々アモルファス沈殿の形成を導く。本発明の方法は、この問題を避ける。

20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

(発明の要旨)

本発明は、上記の障害を克服する。

30

【0015】

より詳細には、本発明は、直径が約0.5~約50ミクロンの範囲、より好ましくは直径が約0.04~約300ミクロンのサイズの範囲である、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPを作製する、単純で、効率的で、高収率の方法に関する。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPは、タンパク質の下流プロセッシング、目的のタンパク質の抽出および凝集体の除去を可能にするバッチにおいて、作製され得る。緩衝剤（例えば、グリシン、酢酸ナトリウム、リン酸塩、クエン酸塩、Tirs、ホウ酸塩およびタンパク質結晶化試薬（例えば、硫酸アンモニウムのような沈殿剤、ポリエチレングリコール（PEG）、PEGモノメチルエーテル、ギ酸ナトリウムおよび時々他の添加剤（例えば、プロピレングリコールまたはエチレングリコール））は、本発明に従うSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPの首尾よい形成に対して重要であると考えられる。これらの試薬は、ゆっくりと添加され、沈殿剤の濃度の非常に漸進的な増加をもたらす。透析は、この目的に特に適しているが、制御された様式における直接的な添加はまた、本発明に従うSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPを生じる。

40

【0016】

本発明の方法において、試薬がタンパク質溶液に直接適用される場合、即時の沈殿を引き起こす傾向がある試薬（例えば、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール（PEG）、PEGモノメチルエーテル（PEG-MME）およびギ酸ナトリウム）は、代わりに、透析によって時間をかけてゆっくりと平衡化される。本質的に、目的のタンパク質を含む、より濃縮されていない溶液で平衡化する場合、より濃縮された結晶化緩衝液は、透析膜を通してゆっくりと通過される。時間をかけてこのプロセスは、目的のタンパク質の効率的な濃度を生じ、それによってSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPの形成をもたらすゆっくりとした沈殿を引き起こす。

50

【 0 0 1 7 】

このプロセスの重要な要素は、タンパク質が、特定のレベルで pH を支持し得る緩衝液（例えば、pH 5.5 の酢酸ナトリウム）中に存在することである。さらに、特定の添加剤（例えば、ポリエリレンジリコール）は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性 SPP の首尾よい形成のために重要であると考えられる。本発明の方法は、広範囲の分子量 (MW)、等電点 (pI) および純度を有する広範囲のタンパク質に適用可能である。本方法に適切なタンパク質としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体および抗体フラグメント、糖タンパク質、酵素、タンパク質ホルモン、ウイルスおよびウイルスタンパク質、レセプター、診断用タンパク質およびペプチド。本発明の方法は、約 4.0 ~ 約 10.0 で変化する pI を有する、多数のモノクローナル抗体および密にグリコシル化された糖タンパク質に対しての、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性 SPP の生産を可能にする。本発明の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性 SPP は、非常に安定性であり、そして希釈緩衝液系においてもなお完全に溶解性を維持したままである。

10

【 0 0 1 8 】

本発明のさらなる実施形態は、方法に関し、この方法によって、例えば、タンパク質が細胞（特に、細菌、卵、山羊乳および牛乳、植物、細胞培養物および組織培養物などを含む）において発現される場合、特定のタンパク質が複合タンパク質混合物から精製され得る。

20

【 0 0 1 9 】

さらなる実施形態は、凝集したタンパク質および凝集していないタンパク質を含有する溶液から凝集したタンパク質を除去する方法に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明のさらなる実施形態は、架橋されたおよび / またはカプセル化された SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性 SPP を包含する。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP を含有する、生物学的に活性なタンパク質または組成物（処方物を含む）の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP に関する。

30

【 0 0 2 2 】**(発明の詳細な説明)**

本明細書中に記載される本発明をより十分に理解するために、以下の詳細な説明を記載する。この説明において、以下の用語を用いる：

非晶質固体 - - タンパク質の非結晶性固体形態であって、時折、非晶質沈殿物と称される。これは、結晶性固体状態に特徴的な分子格子構造を有さない。

40

【 0 0 2 3 】

抗体 - - 身体中の異種分子の存在に応答して、脊椎動物の免疫系のいわゆる液性アームにより生成する約 MW 150 kD の糖タンパク質。抗体は、微生物（例えば、寄生生物、細菌およびウイルス）による感染の予防および回復のために必須である。抗体は、侵入した微生物およびその産物上の、抗原（またはエピトープ）と呼ばれるタンパク質（または時折、他の有機分子（ポリサッカリド、糖タンパク質、脂質または核酸を含む））構造を、非常に特異的な様式で認識しそして結合することによって、その機能を発揮する。抗体は、抗体上の超可変ドメイン（抗原結合部位と呼ばれる）とエピトープ自体との間の非常に特異的な相互作用によって、それらの標的抗原に結合する。抗原に結合すると、抗体は、感染している微生物の中和、破壊および除去に寄与する免疫系の多くのエフェクター系の 1 つ以上を活性化する。

【 0 0 2 4 】

抗体はまた、疾患状態に関与する細胞標的との特異的結合、続くその中和によって、癌、炎症、心臓血管疾患および移植拒絶の処置のために使用される。例えば、モノクローナル抗体のインフリキシマブは、腫瘍壞死因子に結合し、細胞表面レセプターとの相互作

50

用をブロックすることによって、その炎症における役割を中和する；一方、リツキシマブは、悪性Bリンパ球の細胞表面CD20抗原に結合することによって、この悪性Bリンパ球を標的化する。

【0025】

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいは本発明に従うこれらを含む組成物（処方物を含む）に組み込まれ得る、特異的抗体の例としては、とりわけ、抗TNF抗体、抗CD3抗体、抗CD20抗体、抗CD25抗体、抗CD33抗体、抗CD40抗体、抗HER2抗体、抗HBV抗体、抗HAV抗体、抗HCV抗体、抗GPIIb/IIIaレセプター抗体、抗RSV抗体、抗HIV抗体、抗HSV抗体および抗EBV抗体が挙げられる。

10

【0026】

1つの抗体分子は、互いに共有結合した2つの同一の重鎖（各々、約MW50kD）、および2つの同一の軽鎖（各々、約MW25kD）（各々が、これらの重鎖の一方に共有結合している）から構成される構造を有する。これら4つの鎖は、標準的な「Y」モチーフに配置される。「Y」の底の「脚」は、Fc領域（この「c」は、「結晶性」を表す）と呼ばれ、そして抗体を細胞膜内に固定するため、そしてまたマクロファージ細胞に結合しそして補体を活性化するために使用される。「Y」の上部の2つの「アーム」は、Fab領域（この「ab」は、「抗原結合（antigen-binding）」を表す）と呼ばれる。各Fab領域は、定常領域（Fab領域とFc領域の接合部において）、および可変領域（これは「Y」の先端部まで延びる）を含む。各可変領域は、「Y」の各先端部において、同一の抗原結合部位（「超可変」領域と呼ばれる、この可変領域内の領域）を含む。従って、各Fab領域は、1つの抗原結合部位を有し、従って、この完全抗体分子は、2つの結合部位を有する（すなわち、「二重特異性」である）。天然に存在する抗体上の2つの抗原結合部位は、互いに同一であり、従って、この抗体は、1つの抗原に対して特異的である（すなわち、「単一特異性」である）。現在まで、抗体分子の多数の分子フラグメントが、単離されている。これらは、天然には存在しないが、1つ以上の完全抗体分子から操作される。これらのフラグメントとしては、Fabフラグメント（酵素パパインでの消化により、完全抗体から単離される单一のFab）、およびF(ab')₂フラグメント（酵素ペプシンでこの抗体を消化することにより生成する、互いに共有結合した2つのFab）が挙げられる。Fabフラグメントは、単一特異性であり、一方、F(ab')₂フラグメントは、二重特異性である。最近多くの操作された抗体フラグメントが、紹介されている。これには、二重鎖Fv(dsFv)フラグメントおよび单鎖Fv(scFv)フラグメント（両方の場合で、この「v」は、「可変」を表す）が挙げられる。dsFvフラグメントは、Fabフラグメント-定常領域から構成される（すなわち、互いに共有結合した重鎖および軽鎖の可変領域のみから構成される）。scFvフラグメントは、ペプチドリンカーを介して、軽鎖可変領域に結合した重鎖の可変領域から構成される、单一のポリペプチド鎖である。古典的に、dsFvおよびscFvの両方は、一価（従って、単一特異性）である。しかし、2つのdsFvフラグメントまたは2つのscFvフラグメントは、それ自体が連結して、二重特異性フラグメント（これは、定常領域を有さないF(ab')₂フラグメントと類似している）を形成し得る。さらに、2つのdsFvフラグメントまたはscFvフラグメントを異なる抗原結合部位（すなわち、異なる特異性）に連結して、二重特異性フラグメントを形成することが可能である。このようなフラグメントを、研究手段または治療用試薬もしくは診断用試薬のいずれかとして使用し得る。

20

【0027】

ヒトにおいて、5種類の抗体（免疫グロブリンとも呼ばれる）：IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEがあり、これらの各々は、その固有の特性および機能を有する。IgG、IgDおよびIgEは、全て、1つの抗体分子から構成され、一方、IgAは、このような分子の1つ、2つまたは3つから構成され、そしてIgMは、5つの抗体分子から構成される。さらに、ヒトにおいて、IgGの4つのサブクラス（IgG1、IgG2

30

40

50

、 Ig G 3 または Ig G 4)、および Ig M および Ig A の各々の 2 つのサブクラス (それぞれ、 1 および 2) が存在する。例えば、モノクローナル抗体のリツキシマブ (R i t u x a nTM) は、 Ig G 1 抗体である。

【 0 0 2 8 】

天然に存在する抗体は、単一の種由来であるが、操作された抗体および抗体フラグメントは、 1 種より多い動物由来であり得る (すなわち、キメラであり得る) 。現在まで、マウス / ヒトキメラ抗体が、作製されているが、他の種の組合せが可能である。キメラ抗体は、さらに 2 つのサブタイプ : キメラおよびヒト化、に分類されている。キメラ抗体は、マウス / ヒト抗体は、それぞれ、約 75 % のヒトアミノ酸配列および約 25 % のマウスアミノ酸配列を含む。ヒト配列は、その抗体の定常領域を表し、一方、マウス配列は、その抗体の可変領域を表す (従って、抗原結合部位を含む) 。このようなキメラを使用するための原理は、マウス抗体の抗原特異性を保持するが、マウス抗体の免疫原性を減少させることであり (マウス抗体は、マウス以外の種において、このマウス抗体に対する免疫応答を起こす) 、従って、ヒトの治療においてこのキメラを用い得る。キメラ抗体はまた、異なるヒト抗体由来の C D R 領域を含む抗体を含む。

10

【 0 0 2 9 】

あるいは、キメラ抗体は、ある抗体由来のフレームワーク領域、および別の抗体由来の C D R 領域を含む。キメラ抗体はまた、少なくとも 2 種の異なるヒト抗体由来の C D R 領域を含む抗体を含む。ヒト化抗体は、約 90 % (またはそれ以上) のヒトアミノ酸配列を含む。存在するマウス配列のみが、超可変領域についての配列 (これは、その可変領域に含まれる実際の抗原結合部位である) である。ヒト化抗体は、キメラ抗体と比較して、最小のマウス免疫原性を有する。

20

【 0 0 3 0 】

操作された抗体および抗体フラグメントとしてはまた、とりわけ、非グリコシル化抗体および抗体フラグメントが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

一般に、 2 つのタイプの抗体が存在し、これらはその特異性 (ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体) により区別され得る。ポリクローナル抗体は、血液の免疫グロブリン画分として見出される抗体であり、本質的に、個体が曝された異なる抗原に特異的な多くの異なるタイプの抗体のポリクローナル混合物である (すなわち、これらは、抗体を產生する細胞である B リンパ球 (または B 細胞) の多くの異なるクローニング由来である) 。

30

【 0 0 3 2 】

モノクローナル抗体は、単一の特異性の抗体である (すなわち、これらは B リンパ球 (B 細胞) の単一のクローニング由来である) 。これらの抗体は、その標的抗原に対する精巧な特異性を有し、そしてまたは大量で (すなわち高力価で) 產生され得る。これらは、特定の抗原 (例えば、癌抗原) に対するマーカーとして、診断剤として (例えば、 H I V - 1 のようなウイルスを検出するためのアッセイにおいて) 、および治療剤として、有用である。インタクトなモノクローナル抗体は、 2 つの完全な重鎖および 2 つの完全な軽鎖を含む古典的な分子構造を有する抗体である。これは、抗体フラグメント (例えば、 F a b 、 F (a b')₂ 、 F c フラグメント、 d s F v フラグメントおよび s c F v フラグメントと区別される) 。

40

【 0 0 3 3 】

従来的に、モノクローナル抗体は、抗体產生 B 細胞を不死化ハイブリドーマ細胞と融合して、細胞培養物中でモノクローナル抗体を連続的に產生する B 細胞ハイブリドーマを生成することにより作製されている。しかし、現在、モノクローナル抗体は、遺伝子改変動物 (例えば、ウシおよびヤギ (Genzyme Trasgenics) 、ブタおよびウサギ (Pharmingen, PPL Therapeutics) 、ニワトリ (Transrogen)) において、ならびに植物 (例えば、タバコおよびトウモロコシ (Epicyte, Integrated Protein Technologies, Meristem CropTech 、他) において、インビトロで大量生産され得る。例え

50

ば、多量のモノクローナル抗体は、ヤギの乳汁 (Genzyme Trasgenics) において見出され得る。全てのこのような供給源由来の抗体は、本発明に従って、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPを調製するために使用され得る。さらに、トランスジェニック体の結果として、マウスは、ヒトB細胞ゲノム全体（これはヒト抗体をコードする）を含みそして発現するように改変されている。従って、このようなトランスジェニックマウス (Abgenix) は、本発明に従うヒト抗体の供給源である。グリコシリ化が、この抗体を産生する動物に特異的であることに注意すべきである。例えば、このことは、ヒト以外の供給源由来のヒト抗体が、微妙に異なるグリコシリ化特性を有することを意味する。従って、本発明において有用なインタクトな抗体または単鎖Fvフラグメントは、改変されたグリコシリ化を示し得るか、または脱グリコシリ化され得る。本発明に従って作製され得る、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子および結晶性抗体SPPはまた、誘導体化抗体を含む。このような抗体としては、ポリエチレングリコール、あるいは少なくとも1つの糖部分または少なくとも1つのメチル基もしくはエチル基で誘導体化された抗体が挙げられる。

【0034】

臨床的に適切な抗体はまた、これらの抗体が使用される治療領域に従って分類され得る。このような抗体としては、例えば、癌（例えば、膵臓癌）、炎症疾患（例えば、自己免疫疾患、関節炎）、心血管疾患（例えば、発作）、感染疾患（例えば、HIV/AIDS）、呼吸疾患（例えば、喘息）、組織移植拒絶および器官移植拒絶を処置するための抗体が挙げられる。このような抗体はまた、放射線免疫療法のための抗体も含む。本発明に従って結晶化され得る抗体としては、例えば、Abciximab、Palivizumab、Murumonab-CD3、Gemtuzumab、Trastuzumab、Basiliximab、Dacizumab、Etanercept およびZevalinが挙げられる。

【0035】

抗体活性放出速度 - 単位時間当たり溶解したインタクトな抗体の量。単位時間当たり溶解した単鎖Fv抗体フラグメントの量は、「単鎖Fv抗体フラグメント放出速度」である。

【0036】

抗体SPP - 抗体もしくは抗体の組み合わせの、ゆっくりとした制御された沈殿によって形成される、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性SPP。抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPは、任意の他の薬学的または診断的二受容可能な第二の成分と合わされて、組成物を形成し得る。あるいは、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPは、ポリマー性キャリア内にカプセル化されて、被覆された粒子（組成物の1実施形態である処方物）を形成し得る。

【0037】

あるいは、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子もしくは結晶性抗体SPP、またはその組成物もしくは処方物は、抗体フラグメント（とりわけ、単鎖Fv抗体フラグメント）から形成され得る。

【0038】

抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPは、球状形態を有し、そして直径約0.04ミクロン～約300ミクロンの範囲のサイズを有する。

【0039】

抗原 - 抗体によって特異的に認識される任意の物質 (substance) または物質 (material)。抗原は、代表的に、細胞または侵入する微生物の表面上に見出されるタンパク質の小さい断片（ペプチド）である。抗体は、4アミノ酸長ほどの小さい抗原を特異的に認識し得ると考えられ、そしてたった1つのアミノ酸の置換が、その特定の抗原の抗体認識を破壊し得る。

【0040】

抗原性 - その抗原に対して以前に惹起された抗体により結合される、抗原の能力。抗原は、その抗原に対して標的化された抗体によって結合され得る場合に、その抗原性コンフォ

10

20

30

40

50

メーションにあるといわれる。これは、免疫原性（これは、そのネイティブのコンフォメーションで抗原を提示している微生物を次に中和する抗体の產生を誘発する、抗原の能力である）とは異なる。

【0041】

抗イディオタイプ抗体 - 他の抗体の抗原結合部位に対する特異性を有する抗体。抗イディオタイプ抗体は、以下の様式で產生される：抗原は、その抗原に特異的な抗体（A b - 1 またはイディオタイプと称される）の產生を誘発する。次いで、これらの抗体（イディオタイプ）は、それ自体免疫原として使用されて、A b - 1 に特異的な第二世代の抗体を誘発する。これらの第二世代の抗体（A b - 2）は、抗イディオタイプ抗体（すなわち、抗イディオタイプ）と称され、そしてA b - 1 を產生するために最初に使用された抗原を模倣するかまたはこの抗原に密接に関連するかのいずれかである。このような反応は、抗原性刺激に応答してインビボでも天然に生じ、そしてこれらの抗体 - 抗体相互作用によって、免疫系は、本質的にそれ自体と相互作用し得る。この能力を利用することによって、抗イディオタイプ抗体が、特定の感染を予防するため、そして数種の癌ならびに種々の免疫疾患および自己免疫疾患を処置するために使用され得ることが想定される。10

【0042】

抗体半減期 - インビボの抗体についての、所定量の抗体がその最初の濃度の50%にまで減少する時間。IgGは、代表的に、約21日間の半減期を有する（しかし、IgG3は、たった7日間の半減期を有する）が、一方でIgM、IgA、IgDおよびIgEは、それぞれ、10日間、6日間、3日間および2日間の代表的な半減期を有する。所定量の単鎖Fv抗体フラグメントが、その最初の濃度の50%にまで減少する時間は、「単鎖Fv抗体フラグメント半減期」である。20

【0043】

抗体負荷 - 乾燥組成物の重量に対する抗体の重量%として計算されるような、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPの組成物（処方物を含む）の抗体含量。抗体負荷の代表的な範囲は、約1%～約80%である。乾燥組成物の重量に対するフラグメントの重量%として計算されるような、Fv抗体フラグメントSPP、球状ナノクリスタル複合Fv抗体フラグメント粒子または結晶性Fv抗体フラグメントSPPの、組成物（処方物を含む）の単鎖Fv抗体フラグメント含量は、「単鎖Fv抗体フラグメント負荷」である。30

【0044】

抗体放出 - 以下の要因のうち1つ以上によって制御されるような、ポリマー性キャリアからの活性タンパク質の放出：（1）ポリマーマトリックスの分解；（2）ポリマーマトリックス内の結晶溶解速度；（3）ポリマーマトリックスを介した溶解タンパク質の拡散；（4）タンパク質負荷；および（5）抗体結晶／ポリマーマトリックス中への生物学的媒体の拡散。

【0045】

生体適合性ポリマー - 非抗原性（アジュバントとして使用されない場合）、非発癌性、非毒性であり、さもなければ生きている生物と本質的に非適合性ではない、ポリマー。例としては、以下が挙げられる：ポリ（アクリル酸）、ポリ（シアノアクリレート）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（デブシペプチド）、ポリ（エステル）（例えば、ポリ（乳酸）すなわちPLA、ポリ（ラクチック-co-グリコール酸）すなわちPLGA、ポリ（-ヒドロキシブチレート（hydroxybutyrate）、ポリ（カプロラクトン）およびポリ（ジオキサン））；ポリ（エチレンギリコール）、ポリ（ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド、ポリ[（有機）ホスファゼン]、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、フルロニックポリオール、アルブミン、アルギメント、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン（glycaminoglycan）、硫酸化多糖、これらのブレンドおよびコポリマー。40

【0046】

生分解性ポリマー - 加水分解または可溶化によって分解するポリマー。分解は、不均一（粒子表面に主に生じる）もしくは均一（ポリマーマトリックス全体での均一な分解）、またはこのようなプロセスの組み合わせであり得る。

【0047】

抗体の生物学的活性の決定のためのバイオイムノアッセイ - 抗体の生物学的活性（とりわけ、直接的細胞傷害性、補体依存的細胞傷害性（C D C）および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（A D C C）を含む）を決定するために使用され得る、任意のイムノアッセイ。実施例 15～18 および図 9 および図 10 を参照のこと。

【0048】

生物学的高分子 - タンパク質、デオキシリボ核酸（D N A）およびリボ核酸（R N A）のような生物学的ポリマー。本出願の目的について、生物学的高分子は、高分子とも称される。

【0049】

補体 - 免疫の主なエフェクター機構の 1 つを形成する、約 20 種の酵素、プロ酵素および他のタンパク質についての集合的な用語。それ自体は非抗原特異的であるが、補体系は、高度に特異的な抗体媒介性の免疫応答の最終的なエフェクター機構である。

【0050】

組成物 - 規定された比率で維持された異なる成分の混合物。S P P 組成物、球状ナノクリスタル複合粒子組成物、または結晶性 S P P 組成物は、1 種以上の薬学的もしくは診断的に受容可能な成分もしくは賦形剤（糖および生体適合性ポリマーを含む）と組み合わせた、S P P、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性 S P P を含む。組成物の 1 実施形態は、処方物であり、これは、本発明に従う S P P、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性 S P P であり、ポリマー性キャリア内にカプセル化されて、被覆された粒子を形成している（すなわち、少なくとも 1 つの成分が、S P P、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性 S P P に添加された、組成物）。賦形剤の例は、Handbook of Pharmaceutical Excipients (the American Pharmaceutical Association および the Pharmaceutical Society of Great Britain の共同出版) に記載される。「除染のための処方物」とは、以下からなる群より選択される処方物である：化学廃棄物、除草剤、殺虫剤、農薬および環境危険の除染のための処方物。

【0051】

制御された溶解 - 制御された様式での、タンパク質（とりわけ、インタクトな抗体または単鎖 F v 抗体フラグメントを含む）の S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P の溶解、またはこのような S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P を含む組成物もしくは処方物の溶解。溶解は、以下からなる群より選択される因子によって、制御される：上記 S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P の表面積；上記 S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P のサイズ；上記 S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P の形状；S P P、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性 S P P の組成物もしくは処方物の、賦形剤成分の濃度；賦形剤成分の数および性質；賦形剤成分の分子量；ポリマー性キャリアの性質；ならびにこれらの組み合わせ。

【0052】

コポリマー - 1 種以上のモノマー種から形成されるポリマー。

【0053】

結晶 - 結晶、例えば、結晶性 S P P またはナノクリスタル（球状ナノクリスタル複合粒子を形成する単一のナノクリスタルまたはナノクリスタルの凝集体）は、物質の固体状態の 1 形態であり、第二の形態（非晶性固体状態（これは、本質的に、組織化されていない固体として存在する））とは別個である。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体のようなタンパク質）または分子アセンブリ（例えば、抗原 / 抗体複合体）の規則的な三次元

10

20

30

40

50

アレイである。結晶は、非対称単位と称される構築ブロック（これは、結晶化される物質からなる）（これは、三次元で反復される単位格子へと、十分規定された対称性に従って配置される）の格子アレイである。Giege, R. およびDucruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical approach, 第二版, pp. 1-16, Oxford University Press, New York, New York (1999) を参照のこと。

【0054】

診断的有効量 - いくらかの期間にわたってそれが投与される生きた生物において、微生物による感染を診断するために有効な、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはこれらの組成物もしくは処方物の量。

10

【0055】

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの乾燥-N₂、空気もしくは不活性気体での乾燥、減圧オープン乾燥、凍結乾燥、揮発性有機溶媒での洗浄およびその後の溶媒のエバボレーション、またはヒュームフードにおけるエバボレーションを含む手段による、水、有機溶媒または液体ポリマーの除去。代表的には、乾燥は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、自由に流動する粉末となる場合に達成される。乾燥は、湿ったSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP上に、気体の流れを通過させることによって実施され得る。この気体は、以下からなる群より選択され得る：窒素、アルゴン、ヘリウム、二酸化炭素、空気またはこれらの組み合わせ。

20

【0056】

有効量 - いくらかの期間にわたってそれが投与される被験体もしくは領域を、処置、免疫、ブースト、保護、修復または解毒するのに有効な、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはこれらの組成物もしくは処方物の量。

【0057】

乳化剤 - SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPと溶液との間の界面張力を低減する、界面活性剤。あるいは、乳化剤は、ポリマー被覆されたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPと溶液との間の界面張力を低減する。

30

【0058】

糖タンパク質 - 糖質に共有結合したタンパク質またはペプチド。この糖質は、モノマーであっても、オリゴ糖から構成されてもよい。

【0059】

ホモポリマー - 単一のモノマー種から形成されるポリマー。

【0060】

免疫療法タンパク質 - 腫瘍細胞、ウイルスもしくは細菌に対する保護免疫を誘導する活性、またはこの腫瘍細胞、ウイルスもしくは細菌を減少または排除するように、免疫系を刺激する活性を有する場合、タンパク質は免疫療法的である。

40

【0061】

不溶性形態および安定形態 - 水性溶媒、有機溶媒または水性 - 有機性溶媒混合物中で不溶性であり、そしてSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPのタンパク質の成分の不溶性形態よりも高い安定性を示す、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの形態。任意の実施形態において、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、不溶性形態で活性であり得る。そして1実施形態において、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、不溶性形態で活性であり得、次いで一旦その機能が完了すると、溶解するか、または除去もしくは消化される。

【0062】

標識 - SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPへの標識の取り込み。標識は、放射性標識、酵素標識、毒素、磁性因子または薬物結合体からなる群より選択され得る。

【0063】

50

液体ポリマー - 水性溶媒および有機溶媒の非存在下での、純粹な液相の合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール（PEG））。

【0064】

高分子 - タンパク質分子、糖タンパク質分子、ペプチド分子、治療タンパク質分子、DNA分子またはRNA分子。

【0065】

投与方法 - SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはこれらを含む組成物もしくは処方物は、種々の投与様式に適切であり得る。これらとしては、経口投与および非経口投与が挙げられる。非経口投与の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：皮下、静脈内、経皮、筋内、肺吸入、病変内、局所的投与、針なし注射、皮下注射、針なし皮下投与またはエアロゾル送達。10

【0066】

母液 - 高分子（例えば、タンパク質、核酸）のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを作製するために使用される、調製緩衝液。

【0067】

有機溶媒 - 液体ポリマーおよびその混合物を含む、非水性起源の任意の溶媒。本発明に適切な有機溶媒としては、以下が挙げられる：アセトン、メチルアルコール、メチルイソブチルケトン、クロロホルム、1-プロパノール、イソプロパノール、2-プロパノール、アセトニトリル、1-ブタノール、2-ブタノール、エチルアルコール、シクロヘキサン、ジオキサン、酢酸エチル、ジメチルホルムアミド、ジクロロエタン、ヘキサン、イソオクタン、塩化メチレン、tert-ブチルアルコール、トルエン、四塩化炭素またはこれらの組み合わせ。20

【0068】

ペプチド - 小さい～中間の分子量、通常3～35アミノ酸残基であり、そしてしばしばより大きいタンパク質のフラグメントを示すが、必ずしもそうではない、ポリペプチド。

【0069】

薬学的有効量 - いくらかの期間にわたってそれが投与される生きた生物においてある状態を処置するために有効な、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはこれらの組成物もしくは処方物の量。

【0070】

予防的有効量 - いくらかの期間にわたってそれが投与される個体において感染を予防するために有効な、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはこれらの組成物もしくは処方物の量。30

【0071】

成分 - 薬学的成分または賦形剤を含む、任意の成分または賦形剤。賦形剤としては、例えば、以下が挙げられる：

(酸性化剤)

酢酸、氷酢酸、クエン酸、フマル酸、塩酸、希塩酸、リンゴ酸、硝酸、リン酸、希リン酸、硫酸、酒石酸。

【0072】

(エアロゾル噴霧体)

ブタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、イソブタン、プロパン、トリクロロモノフルオロメタン40

(空気置換)

二酸化炭素、窒素

(アルコール変性剤)

安息香酸デナトニウム、メチルイソブチルケトン、スクロースオクトアセテート(Octoate)

(アルカリ化剤)

強アンモニア溶液、炭酸アンモニウム、ジエタノールアミン、ジイソプロパノールアミン

40
50

、水酸化カリウム、重炭酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、トロラミン

(抗ケーリング剤) (流動促進剤 (glidant) を参照のこと)

(消泡剤)

ジメチコーン、シメチコン

(抗菌保存剤)

塩化ベンザルコニウム、塩化ベンザルコニウム溶液、塩化ベンゼルトニウム (benzethonium chloride)、安息香酸、ベンジルアルコール、ブチルパラベン、塩化セチルピリジニウム、クロロブタノール、クロロクレゾール、クレゾール、デヒドロ酢酸、エチルパラベン、メチルパラベン、メチルパラベンナトリウム、フェノール、フェニルエチルアルコール、酢酸フェニル水銀、硝酸フェニル水銀、安息香酸カリウム、ソルビン酸カリウム、プロピルパラベン、プロピルパラベンナトリウム、安息香酸ナトリウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸、チメロサール、チモール

(抗酸化剤)

アスコルビン酸、アスコルビル酸パルミテート (ascorbyl palmitate)、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、次亜リン酸、モノチオグリセロール、没食子酸プロピル、ホルムアルデヒドスルホキシル酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、二酸化硫黄 (sulfur dioxide)、トコフェロール、トコフェロール賦形剤

(緩衝化剤)

酢酸、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸、クエン酸カリウム、メタリン酸カリウム、一塩基のリン酸カリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム溶液、二塩基のリン酸ナトリウム、一塩基のリン酸ナトリウム

(カプセル潤滑剤)

(錠剤およびカプセル潤滑剤を参照のこと)

(キレート剤)

エデト酸二ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸および塩、エデト酸

(コーティング化剤)

カルボキシメチルセルロースナトリウム、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、エチルセルロース、ゼラチン、製薬グレイズ、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、メタクリル酸コポリマー、メチルセルロース、ポリエチレングリコール、ポリ酢酸ビニルフタレート、セラック、ショ糖、二酸化チタン、カルナバワックス、微結晶性ワックス (microcrystalline wax)、ゼイン

(着色剤)

キャラメル、赤、黄色、黒またはブレンド、酸化鉄

(錯化剤)

エチレンジアミン四酢酸および塩 (EDTA)、エデト酸、ゲンチシン酸エタノールアミド (ethanolamide)、硫酸オキシキノリン (oxyquinoline sulfate)

(乾燥剤)

塩化カルシウム、硫酸カルシウム、二酸化シリコン

(乳化剤および/または可溶化剤)

アカシア、コレステロール、ジエタノールアミン (添加剤)、モノステアリン酸グリセリン、ラノリンアルコール、レシチン、モノグリセリドおよびジグリセリド、モノエタノールアミン (添加剤)、オレイン酸 (添加剤)、オレイルアルコール (安定化剤)、ポロキサマー (poloxamer)、ポリオキシエチレン50ステアレート、ポリオキシル35ヒマシ油 (caster oil)、ポリオキシル40硬化ヒマシ油、ポリオキシル

10

20

30

40

50

10 オレイルエーテル、ポリオキシル20セトステアリルエーテル(c e t o s t e a r y l e t h e r)、ポリオキシル40ステアレート、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、プロピレングリコールジアセテート、プロピレングリコールモノステアレート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、ソルビタン(soritan)モノオレエート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ステアリン酸、トロラミン、乳化剤

(濾過助剤)

粉末セルロース、精製ケイソウ土(siliceous earth)

(風味剤および芳香剤)

10

アネトール、ベンズアルデヒド、エチルバニリン、メントール、メチルサリチラート、グルタミン酸ナトリウム、橙花油、ペパーミント、ペパーミント油、ペパーミントスピリット(spirit)、ローズ油、強ローズ水(stronger rose water)、チモール、トルーバルサムチングチャーバニラ、バニラチングチャーバニリン(流動促進剤および/または抗ケーキング剤)

ケイ酸カルシウム、ケイ酸マグネシウム、コロイド状二酸化ケイ素、タルク
(湿潤剤)

グリセリン、ヘキシレングリコール、プロピレングリコール、ソルビトール

(軟膏基剤)

ラノリン、無水ラノリン、親水軟膏、白色軟膏、黄色軟膏、ポリエチレングリコール軟膏、ペトロラタム、親水ペトロラタム、白色ペトロラタム、ローズ水軟膏、スクアレン(可塑剤)

20

ヒマシ油、ジアセチル化モノグリセリド、ジエチルフタレート、グリセリン、モノアセチル化モノグリセリドおよびジアセチル化モノグリセリド、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、トリアセチン、クエン酸トリエチル
(ポリマー膜)

酢酸セルロース

(溶媒)

アセトン、アルコール、希釈アルコール、アミレン水和物、ベンジルベンゾエート、ブチルアルコール、四塩化炭素、クロロホルム、コーン油、綿実油、酢酸エチル、グリセリン、ヘキシレングリコール、イソプロピルアルコール、メチルアルコール、塩化メチレン、メチルイソブチルケトン、鉛油、ピーナッツ油、ポリエチレングリコール、プロピレンカルボネート、プロピレングリコール、ゴマ油、注射用水、注射用滅菌水、灌流用滅菌水、精製水

30

(吸収剤)

粉末セルロース、チャーコウル、精製ケイソウ土

(二酸化炭素吸収剤)

バリウムヒドロキシライム(barium hydroxide lime)、ソーダ石灰
(硬化剤)

40

硬化ヒマシ油、セトステアリルアルコール、セチルアルコール、セチルエーテルワックス、固い脂肪(hard fat)、パラフィン、ポリエチレン賦形剤、ステアリルアルコール、乳化剤、白色ワックス、黄色ワックス
(座剤基剤)

カカオバター、固い脂肪、ポリエチレングリコール

(懸濁剤および/または増粘剤)

アカシア、寒天、アルギン酸、モノステアレートアンモニウム、ベントナイト、精製ベントナイト、マグマベントナイト、カルボマー934p、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロース(carboxymethyl cellulose)ナトリウム12、カラゲニン、微結晶性ナト

50

リウムセルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウムセルロース、デキストリン、ゼラチン、グアルガム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、メチルセルロース、ペクチン、ポリエチレン酸化物、ポリビニルアルコール、ポビドン、プロピレングリコールアルギネット、二酸化ケイ素、コロイド状二酸化ケイ素、ナトリウムアルギネート、トラガカント、キサンタンガム

(甘味剤)

アスパラテーム、デキストレート (dextrose)、デキストロース、賦形剤デキストロース、フルクトース、マンニトール、サッカリン、カルシウムサッカリン、ナトリウムサッカリン、ソルビトール、溶液ソルビトール、ショ糖、圧縮性糖、粉砂糖、シロップ 10

(錠剤結合剤)

アカシア、アルギン酸、カルボキシメチルセルロースナトリウム、微結晶性セルロース、デキストリン、エチルセルロース、ゼラチン、液体グルコース、グアルガム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース (methyl cellulose)、ポリエチレン酸化物、ポビドン、予めゼラチン化したデンプン、シロップ

(錠剤および／またはカプセル希釈剤)

炭酸カルシウム、二塩基のリン酸カルシウム、三塩基のリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、微結晶性セルロース、粉末セルロース、デキストレート、デキストリン、デキストロース 賦形剤、フルクトース、カオリン、ラクトース、マンニトール、ソルビトール、デンプン、予めゼラチン化したデンプン、ショ糖、圧縮性糖、粉砂糖 20

(錠剤崩壊剤 (table disintegrants))

アルギン酸、微結晶性セルロース、クロスカルメローゼ (crosscarmellose) ナトリウム、クロスポビドン (crosspovidone)、ポルアクリリン (polyacrylin) カリウム、デンブングリコール酸ナトリウム、デンプン、予めゼラチン化したデンプン

(錠剤および／またはカプセル化潤滑剤)

ステアリン酸カルシウム、グリセリルベヘナート (glyceryl behenate)、ステアリン酸マグネシウム、軽油、ポリエチレングリコール、ナトリウムステアリルフマレート (sodium stearyl fumarate)、ステアリン酸、精製ステアリン酸、タルク、硬化植物油、ステアリン酸亜鉛 30

(張度剤 (tonicity agent))

デキストロース、グリセリン、マンニトール、塩化カリウム、塩化ナトリウム

(ビヒクル：風味付けおよび／または甘味付け)

芳香エリキシル、化合物ベンズアルデヒドエリキシル、イソ-アルコールエリキシル、ペパーミント水、ソルビトール溶液、シロップ、トルーバルサムシロップ

(ビヒクル：油性)

アーモンド油、コーン油、綿実油、オレイン酸エチル、ミリスチル酸イソプロピル、イソプロピルパルミテート、鉱油、軽油、ミリスチル (myristyl) アルコール、オクチルドデカノール、オリーブ油、ピーナッツ油、杏仁油、ゴマ油、大豆油、スクアレン 40

(ビヒクル：固体キャリア)

糖スフィア

(ビヒクル：無菌)

注射用静菌性水、注射用静菌性塩化ナトリウム

増粘剤 (懸濁剤を参照のこと)

撥水剤 (water repellent agent)

シクロメチコーン (cycloheximethicone)、ジメチコーン、シメチコン

(湿潤剤および／または可溶化剤)

塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム、ドキュセートナトリウム、ノノキシノール9、ノノキシノール10、オクトキシノール9、ポリキサマー

50

、ポリオキシル35ヒマシ油、ポリオキシル40、硬化ヒマシ油、ポリオキシル50ステアレート、ポリオキシル10オレイルエーテル、ポリオキシル20、セトステアリルエーテル、ポリオキシル40ステアレート、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート(mono laurate)、ソルビタンモノオレエート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、チロキサポール

好みの成分または賦形剤としては、以下の塩が挙げられる：

1) アミノ酸(例えば、グリシン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アスパラギン、グルタミン、プロリン)、2) 炭水化物、単糖(例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、マンノース、アラビノース、キシロース、リボース)、および3) 二糖(例えば、ラクトース、トレハロース、マルトース、ショ糖)および4) 多糖(例えば、マルトデキストリン(maltodextrin)、デキストラン、デンプン、グリコーゲン)、および5) アラビトール(例えば、マンニトール、キシリトール、ラクチトール(lactitol)、ソルビトール)、6) グルクロロン酸、ガラクトロン酸、7) シクロデキストリン(例えば、メチルシクロデキストリン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、ならびに同様に8) 無機塩類(例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カリウム、ホウ酸炭酸アンモニウムおよびリン酸アンモニウム、ならびに9) 有機塩類(例えば、酢酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、乳酸塩)、10) 乳化剤または可溶化剤(アカシア、ジエタノールアミン、モノステアリン酸グリセリン、レシチン、モノエタノールアミン、オレイン酸、オレイルアルコール、ポリキサマー、ポリソルベート、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノステアレート、および他のソルビタン誘導体、ポリオキシル誘導体、ワックス、ポリオキシエチレン誘導体、ソルビタン誘導体のような)、11) 増粘剤(寒天、アルギン酸およびその塩、グアルガム、ペクチン、ポリビニルアルコール、ポリエチレン酸化物、セルロースおよびその塩の誘導体、炭酸プロピレン、ポリエチレングリコール、ヘキシレングリコール、チロキサポールのような)。賦形剤または成分のさらに好みの群としては、以下が挙げられる：ショ糖、トレハロース、ラクトース、ソルビトール、ラクチトール、イノシトール、(酢酸、リン酸、クエン酸、ホウ酸のような)ナトリウムおよびカリウムの塩、グリシン、アルギニン、ポリエチレン酸化物、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ヘキシレングリコール、メトキシポリエチレングリコール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン。

【0073】

(ポリマー)

高分子は、小さな単純な化学単位の繰り返しによって構築される。この繰り返し単位は、相互連絡ネットワークを形成するために直線または分枝であり得る。この繰り返し単位は、通常、このモノマーに等価かまたはほぼ等価である。

【0074】

(ポリマー・キャリア)

SPPタンパク質成分の送達(生物学的送達を含む)のための、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子(spherical nanocrystalline composite particle)または結晶SPPのカプセル化に使用されたこのようなポリマーとしては、生物適合性ポリマーおよび生分解性ポリマーが挙げられる。ポリマー・キャリアは、単一のポリマー型であり得るか、またはポリマー型の混合物からなり得る。ポリマー・キャリアとして有用なポリマーとしては、例えば、以下が挙げられる：ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)(例えば、ポリ(乳酸)もしくはPLA、ポリ(乳酸- α -グリコール酸(lactic-co-glycolic acid))もしくはPLGA、ポリ(B-ヒドロキシ酪酸)、ポリ(カプロラクトン)およびポリ(ジオキサン)；ポリ(エチレングリコール)、ポリ((ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、

10

20

30

40

50

ポリ[（オルガノ）ホスファゼン]、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、無水マレインアルキル（maleic anhydride alkyl）ビニルエーテルコポリマー、フルロニックポリオール）、アルブミン、天然ポリペプチドおよび合成ポリペプチド、アルギネート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン（glycaminoglycan）、硫酸化多糖、修飾したデンプン（例えば、アミロースデンプン、アミロペクチンデンプン、ヒドロキシエチルデンプン、メタクリレートデンプン、および他のデンプン、ならびにタンパク質SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPをカプセル化し得る慣習的な材料。

【0075】

10

（タンパク質）

炭素、水素、酸素、窒素および通常、硫酸を含む複合体高ポリマーであり、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸鎖からなる。タンパク質の分子量の範囲は、1000ダルトンのペプチドから600～1000キロダルトンの糖タンパク質を含む。

【0076】

（タンパク質送達系）

タンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPP、あるいはそれらの組成物または処方物の1つ以上を、生物学的存在（biological entity）に対して投与するための方法または手段。

【0077】

20

（予防的（prophylactically）有効量）

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPP、あるいはそれらの組成物または処方物の、生存する生物における微生物による感染を防ぐのに有効な量。これは、ある期間にわたって投与される。

【0078】

（放射標識）

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPへの放射標識の組み込み。放射標識の半減期が短い場合（ ^{131}I または ^{90}Y のように）、この放射標識はまた、治療剤（例えば、癌に対する放射免疫療法において使用される）となり得る。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する種々の方法は、当業者に公知であり、使用され得る。標識の例としては、以下の放射性同位体または放射線核種が挙げられるが、これらに限定されない： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I および ^{131}I 。

30

【0079】

（再構成）

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPP、あるいはそれらの組成物または処方物の、適切な緩衝剤または薬学的賦形剤または成分中における分解。

【0080】

40

（貯蔵安定性の欠如）

特定の条件下でインキュベートした時間にわたる、可溶性タンパク質相対物との比較としての、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのタンパク質成分の比活性および/または二次構造または三次構造の変化の欠如。

【0081】

（球状タンパク質粒子（SPP））

天然の粗い球状であり、そして遠心分離および濾過のような方法によって単離され得る形態を有する別個のタンパク質粒子。SPPまたは結晶SPPの1実施形態は、いわゆる「球状ナノクリスタル複合粒子（spherical nanocrystalline composite particle）」である。球状ナノクリスタル複合粒子は、直径約1～約300マイクロメートル（μm）の全体の直径を有するタンパク質粒子である。球状ナノ粒子複合粒子は、約40～約999ナノメートル（nm）の直径を有する、「

50

「ナノクリスタル」と言われるタンパク質結晶を含む。これらのタンパク質ナノクリスタルは、巨大な球状ナノクリスタル複合粒子の全体にわたって不均質にアレンジされ得るか、または層状の殻構造においてアレンジされ得る。さらに、このナノクリスタルは、孔および直径（across）（端から端まで）約1nm～約100nmの開口部を備えるチャネルを形成するような方法において、球状ナノクリスタル複合粒子内でアレンジされ得る。

【0082】

（結晶性球状タンパク質粒子（SPP））

タンパク質が結晶性形態であるか、天然の結晶性であるSPP。約40nm～約999nmの範囲の直径を有する結晶SPPは、「ナノクリスタル」SPPである。

10

【0083】

（安定性の欠如）

特定の条件下での溶液中での時間にわたる、可溶性タンパク質相対物との比較としての、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのタンパク質成分の比活性および／または二次構造または三次構造の変化の欠如。

【0084】

（安定性）

凝集を防ぐプロセス。賦形剤または成分を有するSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの組成物または処方物を調製することによる、可溶性タンパク質相対物との比較としての、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのタンパク質成分の比活性および／または二次構造または三次構造の変化の欠如。

20

【0085】

（治療用SPP、治療用球状ナノクリスタル複合粒子または治療用結晶SPP）

上記のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、組成物もしくは処方物、または薬学的組成物もしくは薬学的処方物において、生存する生物に投与される。

【0086】

（ワクチンSPPまたはワクチン球状ナノクリスタル複合粒子またはワクチン結晶性SPP）

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、病原因子（例えば、ウイルス、寄生生物、細菌または腫瘍細胞）由来の抗原のタンパク質成分。このようなワクチンSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPのタンパク質活性は、病原因子または腫瘍に特異的な保護免疫応答の誘導である。

30

【0087】

（本発明の方法に従うSPPの処方物）

本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、沈殿剤濃度の非常に漸増的な増加を生じるような、タンパク質結晶化剤／沈殿剤のゆっくりとした添加によって作製され得る。透析は、このようなゆっくりとした変化を生じるために使用され得る。しかし、制御された様式での直接添加は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPもまた生じ得る方法である。透析において、目的の高分子（例えば、酵素、抗体、ホルモン）は、低イオン強度溶液中に存在する。高分子溶液は、半透膜区画を生じる膜またはそれを有する容器中に包まれる。透析の間、透析膜は、低分子およびイオンの通過を選択的に可能にするが、孔の大きさによって、より大きな高分子の通過を妨げる。タンパク質を含む容器または透析チューブは、所望の、pH、イオン強度、リガンド濃度などの特性を有する、より大きな容積の液体中に沈められる。タンパク質溶液は、所望の特徴および成分を徐々に獲得する。透析は、本発明の好ましい方法である。

40

【0088】

あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、制御された様式での沈殿剤／緩衝液の直接添加によって生成され得る（実施例6を参照のこと）。

【0089】

（生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP）

50

P、あるいはこれらを含む組成物または処方物の產生)

(透析方法:)

透析は、タンパク質溶液の成分および飽和度を改変する方法である。高分子(例えば、酵素、抗体またはホルモン)溶液は、半透膜区画を生じる膜またはそれを有する容器中に囲われる。膜は、低分子およびイオンの通過を選択的に可能にするが、孔の大きさによって、より大きな高分子の通過を妨げる。タンパク質を含む容器または透析チューブは、所望の、pH、イオン強度、リガンド濃度などの特性を有する、より大きな容積の液体中に沈められる。タンパク質溶液は、所望の特徴および成分を徐々に獲得する。

【0090】

(Slide-A-Lyzerを使用する透析)

A. この透析方法は、Slide-A-Lyzerと呼ばれるデバイスを使用する(Pierce Chemicals, カタログ番号69570)。本明細書中で使用されるSlide-A-Lyzerは、10kDに分子量カットオフ点を有する。

【0091】

B. 手順:

1. Slide-A-Lyzerユニットを取り、一晩蒸留水中に浸す。

【0092】

2. 別のチューブ(例えば、小さなCentrificonデバイス(Amicon、カタログ番号4208)の下部分)を取り、3.8~3.9mlの、例えば、2.05M硫酸アンモニウム(室温での飽和硫酸アンモニウムが4.1M溶液であると仮定して計算された)、0.1M緩衝液(酢酸、リン酸、Tris)、および1.5%プロピレングリコールで満たす。

試薬を以下の順に添加する: 1)水、2)緩衝液、3)プロピレングリコール、および4)飽和硫酸アンモニウム。

【0093】

3. 3.5mm×3.5mmの攪拌子を、デバイスの下部分に配置する。この攪拌子が、中央で着実に(壁にくっつかない)かき回していることを確実にする。

【0094】

4. ほぼ10~20mg/mlに等しいタンパク質濃度の150~410μlの所望のタンパク質溶液を、Slide-A-Lyzerに入れる。緩衝液/プロピレングリコール/硫酸アンモニウム溶液のレベルの1mmまたは2mm下であるように、膜を浸す。

【0095】

5. エバボレーションを防止するように堅く、Slide-A-Lyzerに蓋をする。適当な温度で、適当な時間透析する。

【0096】

6. 透析後、HPLCおよび顕微鏡検査を使用して、透析の結果を確認し、上清のタンパク質含量を、280nmの光学密度での吸光度を測定することによって決定する。適切な場合はいつでもあるが、沈渣の上の液体の層が消えたすぐ後に、確認し回収する。このことは、以下の理由で重大である:

a) タンパク質がその上で凝集する場合、この凝集物は、まず球体を形成し、上清にモノマーとして所望のタンパク質を残す。この場合、上清が、回収され、別の膜に移され、球体を形成するまで透析を進行させる。

b) 抗体が、清浄化非トランジエニックミルク中でスパイクされる場合、このミルクタンパク質は、最後に球体を形成する傾向があり、従って、所望のタンパク質の効率的な分画を達成するために正確な時間で、透析を停止することは重要である。

【0097】

(非透析方法:)

本発明に従う、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを产生するさらなる方法は、透析を包含しない。代わりに、沈殿性試薬(例えば、硫酸アンモニウム)を、漸増的にゆっくりと添加し、それによって、逐次的様式で、タンパク質溶液の濃度を増

10

20

30

40

50

加し得る。タンパク質溶液混合物は、各々の濃度で1時間、平衡化される。サンプルを、顕微鏡検査によって周期的に分析し、球体形成を決定する。上清中に残存するタンパク質含量、収量、タンパク質の量を、280 nmの光学密度(OD)での分光学およびHPLCによって測定する。

【0098】

(SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPの組成物または処方物の調製：)

本発明の1つの実施形態に従って、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはこれらを含む組成物または処方物は、以下のプロセスによって調製される。

10

【0099】

まず、目的の生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、生成される。次に、糖、糖アルコール、増粘剤、湿潤剤、可溶化剤、緩衝液塩、乳化剤、抗菌剤、抗酸化剤、およびコーティング剤から選択される賦形剤または成分が、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP処方物に直接添加される。賦形剤濃度は、代表的に、約0.01～30%W/Wの間であり、もっとも好ましくは、約0.1～10%の間である。成分濃度は、約0.01～90%の間である。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP濃度は、約0.01～99%の間である。

20

【0100】

次いで、処方物緩衝液は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPから、濾過または濃縮のいずれかによって除去される。続いて、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、室温または約-20～約25との間の温度のいずれかで、必要に応じて、1つ以上の有機溶媒（例えば、エタノール、メタノール、イソプロパノール、または酢酸エチル）の約50～約100%の溶液で、洗浄される。

30

【0101】

次いで、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの上を、窒素、空気、または希ガスのいずれかの流れを通過させることによって乾燥される。あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、空気乾燥、スプレー乾燥、凍結乾燥または真空乾燥によって乾燥される。乾燥は、最終生成物の水分含有量が、約10重量%未満になり、最も好ましくは約5%未満になるまで、洗浄後、少なくとも約1時間～最大で約72時間実施される。最後に、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの微粉化（大きさを減少すること）は、所望される場合、実施され得る。

30

【0102】

本発明の1つの実施形態に従うと、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはこれらを含む組成物または処方物を調製する場合、促進剤（例えば、界面活性剤）は、調製の間に添加されない。賦形剤または成分は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、約1～10%W/Wの間の濃度で、あるいは約0.1～25%W/Wの間の濃度で、あるいは約0.1～50%W/Wの間の濃度で調製された後、調製緩衝液に添加される。賦形剤または成分は、約0.1～3時間、調製緩衝液中で、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPとインキュベートされ、あるいはインキュベーションは、0.1～12時間実施され、あるいはインキュベーションは、0.1～24時間実施される。

40

【0103】

本発明の別の実施形態において、成分または賦形剤は、調製緩衝液以外の溶液に溶解され、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、調製緩衝液から取り除かれ、賦形剤溶液または成分溶液中に懸濁される。成分濃度または賦形剤濃度およびインキュベーション時間は、上記されるものと同じである。

【0104】

50

本発明の別の実施形態に従って、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPのタンパク質成分は、以下の1つ以外のタンパク質である： - L - イズロニダーゼまたはリゾチームまたはアルブミンまたはインシュリンまたはヒト(rh)デオキシリボヌクレアーゼ(DNase)またはカタラーゼ。

【0105】

本発明の別の実施形態に従うと、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPのタンパク質成分は、以下の全て以外のタンパク質である： - L - イズロニダーゼ、リゾチーム、アルブミン、インシュリン、ヒト(rh)デオキシリボヌクレアーゼ(DNase)およびカタラーゼ。

【0106】

(本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPに対する使用)
本発明は、有利には、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはこれらを含む組成物または処方物を提供する。周囲温度または極限温度での貯蔵条件下で、純粋かつ安定である、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを產生することが望ましい。このようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、治療薬またはワクチンの用量処方物のために特に有利な形態を構成する。本発明はまた、固体粒子または非水性溶媒中に分散された粒子のいずれかとして、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの貯蔵のための組成物または処方物を提供する。さらに、本発明は、単一の生物学的に活性なタンパク質の混合物の貯蔵、または互いに相互作用し得るか、もしくはし得ないタンパク質の混合物の貯蔵、に適用され得る。10 20

【0107】

また、固体の、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP調製物は、容易に再構成され、非常に高いタンパク質濃度を有する、すぐに使用できる非経口組成物および処方物を生成する。このようなタンパク質の濃度は、処方物が皮下投与に指向される場合、特に有用であると考えられる。皮下投与について、約1.5ml以下の注射体積が、許容される。従って、毎週、約1mg/kgで投薬されるタンパク質について、少なくとも約50mg/mlのタンパク質濃度が必要とされ、約100~200mg/mlが好ましい。最も好ましい実施形態は、約400mg/mlまでのタンパク質濃度を有する、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの組成物または処方物である。これらの濃度は、凝集体問題に起因して、液体処方物中で達成されることは困難である。これらは、本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPおよびこれらの組成物または処方物において容易に達成され得る。30

【0108】

別の実施形態において、本発明は、抗体のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを生成するための方法を提供し、この抗体としては、モノクローナル抗体、および、また抗体の単鎖Fc(scfv)フラグメントが挙げられ、種々の生物医学的適用において、このようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを使用する。このようなscfvフラグメントは、抗体重鎖の可変領域を、抗体軽鎖の可変領域に、リンカーペプチドを使用して連結することによって構築される。これらの小さな大きさに起因して、scfvフラグメントは、インタクトな抗体よりも容易に組織に貫通し得、従って、特定の適応症に関する有益な治療適用を有し得る。40

【0109】

本発明は、全ての免疫グロブリンクラス(IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、および血清IgA(sIgA))およびサブクラス(IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4、IgM1およびIgM2、ならびにIgA1およびIgA2)、ならびに全ての免疫グロブリンクラスおよびサブクラス由来のscfvフラグメントの、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを含む。

【0110】

別の実施形態において、本発明は、生物学的に活性な、SPP、球状ナノクリスタル複合50

粒子または結晶性 SPP を、貯蔵に適切にするための方法を提供する。

【 0 1 1 1 】

本発明のさらに別の実施形態において、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の水性調製物は、第 1 の溶媒を除去し、残存する SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の固体を、第 2 の有機溶媒を使用して洗浄して水を除去し、その後の非水性溶媒のエバボレーションによって固体にされる。

【 0 1 1 2 】

生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の非水性調製物は、非経口的投与（例えば、皮下的送達および筋内的送達を含む）に特に有用であり、一方、処方物の固体組成物は、肺投与に理想的に適している。当業者に理解されるように、肺送達は、他の投与経路によって送達されることが困難である生体高分子に特に有用である。10

【 0 1 1 3 】

別の実施形態において、本発明に従う、単鎖抗体フラグメントの、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP（インタクトな抗体を含む）および単鎖抗体フラグメントの、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP は、診断法および診断キットに有用である。例えば、このような SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP は、患者または別の標本由来のサンプル中の、標的抗原または抗体の存在を診断するためのキットにおいて使用され得る。このようなキットは、容器を含み、必要に応じて、使用のための指示書を含み得る。キット中の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP は、検出可能な標識で標識され得る。サンプル（例えば、血液サンプル、腫瘍サンプル、細胞サンプル、または組織サンプル）中の標的抗原または抗体を検出するための方法は、サンプルを、本発明に従うタンパク質またはインタクトな抗体もしくは単鎖抗体フラグメントの、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP と混合し、サンプルが、タンパク質、抗体またはフラグメントに結合するかどうかを決定することによって実施され得る。このような方法において使用される、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP は、検出可能な標識で標識され得る。20

【 0 1 1 4 】

あるいは、本発明に従う、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子またはタンパク質の結晶 SPP（例えば、インタクトな抗体または単鎖抗体フラグメント）は、クロマトグラフィーおよび精製方法（例えば、アフィニティクロマトグラフィー）において有用である。例えば、タンパク質のアフィニティマトリクス精製は、以下：30

(a) 結合緩衝液 SPP、インタクトな抗体もしくは SPP の球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶 SPP、単鎖 Fv 抗体フラグメントの球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶 SPP と混合する工程であって、ここでそのような抗体または抗体フラグメントは、精製されるタンパク質に対する親和性を有する、工程；

(b) この結晶 / 緩衝液混合物に、精製されるタンパク質を含むタンパク質溶液を添加する工程；

(c) この混合物全体を、抗体または抗体フラグメントへのこのタンパク質の結合を可能にするのに十分な時間および温度で、インキュベートする工程；

(d) 混合物を、洗浄緩衝液で洗浄する工程；ならびに

(e) タンパク質を、抽出緩衝液を用いて抽出する工程、

により実施され得る。40

【 0 1 1 5 】

（投与および生物学的送達）

現在までのところ、治療的タンパク質（例えば、インタクトな抗体）は、一般的に、これらに特徴的な、わずかな経口のバイオアベイラビリティーおよび短い結晶の持続時間に起因して、頻繁な注射または注入により投与されている。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶 SPP、およびこれらを含む組成物または処方物（これらは、生物学的に活性なタンパク質のマイクロ粒子ベースの持続性放出系を含む）は、有利に、改善された50

患者のコンプライアンスおよび簡便さ、より安定な血中レベルおよび潜在的な容量の減少を可能にする。このことによりなされる、徐放性能力および定常放出能力は、活性タンパク質のより効率的な送達に起因して、減少された投与量を可能にする。有意な経費の削減が、本明細書中に記載される SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、結晶 SPP および組成物または処方物を用いることにより達成され得る。

【0116】

本発明の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP および組成物または処方物は、ネイティブの生物学的に活性なタンパク質の生物学的に活性な二次構造および三次構造の保存を増強する。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP のタンパク質成分の生物学的活性およびコンフォメーションが、多数の方法（とりわけ以下の方法）を用いて、測定され得、そしてそのネイティブの、可溶性対応物と比較され得る。10

【0117】

(1. 二次構造を測定するためのフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法)

FTIR 分光法は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP のタンパク質成分の二次構造の特徴を測定し、そしてそれをそのネイティブの可溶性対応物の二次構造の特徴と比較するための有用な方法である。より詳細には、FTIR 分光法は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP 由来のタンパク質の ヘリックスまたはシート成分を測定し得、そしてそれを、そのネイティブの可溶性対応物の ヘリックスまたは シート成分と比較し得る。実施例 13 を参照のこと。20

【0118】

(2. 三次構造を測定するためのフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法)

FTIR 分光法はまた、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP のタンパク質成分の三次構造の特徴を測定し、そしてそれをそのネイティブの可溶性対応物の三次構造の特徴と比較するのに有用である。実施例 46 を参照のこと。

【0119】

(3. 円二色性 (CD) 分光法)

CD 分光法は、分子構造の特徴の迅速決定のための有用な方法である。CD 分光法は、タンパク質の二次構造（とりわけ、アッセイされるタンパク質の シート成分、 ヘリックス成分、 ターン成分およびランダムコイル成分）の特徴付けを可能にする。CD スペクトルは、核酸の構造（とりわけ、その核酸分子が A 型（A-DNA または A-RNA）、B 型（B-DNA）または Z 型（Z-DNA）のいずれかである）の型の特徴付けをさらに可能にする。この様式において、溶解した SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP または球状核酸粒子、球状ナノクリスタル核酸粒子または結晶球状核酸粒子由来のタンパク質または核酸の二次構造が、それらの可溶性対応物と比較され得る。実施例 44 を参照のこと。30

【0120】

(4. モノクローナル抗体の、その抗原への特異的結合を測定するための ELSA)

酵素連結免疫吸着剤アッセイが、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 SPP 由来のタンパク質の抗原性コンフォメーションを、そのネイティブの可溶性対応物の抗原性コンフォメーションと比較するために、そのネイティブの可溶性対応物に特異的に結合するモノクローナル抗体を使用することによって用いられ得る。実施例 45 を参照のこと。40

。

【0121】

(5. 抗体の生物学的活性を決定するためのバイオイムノアッセイ)

あるいは、抗体 SPP、抗体球状ナノクリスタル複合粒子または抗体結晶 SPP のタンパク質成分の生物学的活性が、バイオイムノアッセイによって決定され得る。バイオイムノアッセイは、抗体の生物学的活性を測定するために有用である。抗体の生物学的活性を測定するためのバイオイムノアッセイとしては、とりわけ、下記の直接的細胞傷害、補体依存性細胞傷害 (CDC)、および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) が挙げられる。これらのアッセイは、抗体 SPP、抗体球状ナノクリスタル複合粒子または抗体結晶50

S P P の由来抗体の残余の生物学的活性を、これらの可溶性抗体の対応物の残余の生物学的活性と比較するのに有用である。この様式において、抗体由来の S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P の作製、短期または長期にわたる保存、乾燥、ならびに S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶 S P P の組成物または処方物の形成および引き続くその溶解の効果が、決定され得、そして問題の抗体の可溶性対応物と比較され得る。

【 0 1 2 2 】

その抗原保有標的細胞上の抗体の細胞傷害が、3つのアッセイ（例えば、直接的細胞傷害、補体依存性細胞傷害（ C D C ）、および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ A D C C ））により特徴付けられ得る。 R i t u x a n についての標的細胞は、それらの表面上の C D - 2 0 抗原を過剰発現（ o v e r e x p r e s s ）する細胞であり、それらの細胞としては、 R a j i 、 D a u d i 、 J O K 1 、および W T 1 0 0 が挙げられる。 H e r c e p t i n に特異的な抗原は、 H E R 2 （ヒト表皮増殖因子レセプター2タンパク質）であり、これは、ヒト胸部腺癌細胞株（ S K - B R - 3 、 B T 4 7 4 、および M C F / H E R 2 を含む）において過剰発現される。

【 0 1 2 3 】

本発明の S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P ならびにそれらの組成物および処方物は、活性タンパク質を、被験体に対してそれらが必要とされる場所および時間に叙放し得るレザバを作製する。次いで、生物学的に活性なタンパク質が、特定のカプセル化技術、ポリマー処方物、 S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P の大きさ、 S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P の可溶性、ならびに用いられる任意の賦形剤の存在および性質により規定される期間にわたり、制御された様式で放出される。本発明の S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P ならびにそれらの組成物および処方物は、生物学的に活性なタンパク質の非経口投与のための希釈剤を用いて再構築され得る。

【 0 1 2 4 】

本発明に従う組成物の1つの実施形態は、処方物である。本発明に従うポリマー送達キャリア中に生物学的に活性なタンパク質 S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P を含む処方物はまた、ワクチン、医薬、個人医療用（ p e r s o n a l c a r e ）の処方物もしくは処方物、獣医学的処方物もしくは組成物、または経口酵素補充において用いられる任意の従来のキャリアまたはアジュvantを含み得る。これらのキャリアおよびアジュvantとしては、例えば、フロイントアジュvant、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、緩衝物質（例えば、ホスフェート）、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、植物性飽和脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩または電解質（例えば、硫酸プロタミン）、リン酸水素二ナトリウム、塩化水素、亜鉛塩、コロイドシリカ、マグネシウム、トリシリケート、セルロースベース物質およびポリエチレングリコールが挙げられる。局所形態およびゲルベースの形態のためのアジュvantとしては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよびウッドワックスアルコール（ w o o d w a x a l c o h o l ）が挙げられ得る。

【 0 1 2 5 】

本発明の1つの実施形態に従って、生物学的に活性なタンパク質の S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P （インタクトな抗体または単鎖 F v 抗体フラグメントを含む）は、放出制御投与（薬学的放出制御投与およびキャリアを含まない薬学敵放出制御投与）を含む）のための用いられる任意の従来の物質と組み合わせられ得る。そのような物質としては、例えば、コーティング、シェル、およびフィルム（例えば、腸溶コーティングおよびポリマーコーティングおよびフィルム）が挙げられる。

【 0 1 2 6 】

組成物（ S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P を含む処方物を含む）は、ヒト、動物、または植物に、本発明に従う所望の送達部位で送達され得る。そのような

10

20

30

40

50

送達としては、非経口投与、(例えば、皮下注射、静脈注射、または筋肉内注射を含む)、もしくはデバイス(例えば、移植可能なデバイス)の使用が挙げられ得るか、または、他の送達システム(例えば、経口投与、経肺投与、吸入、経皮投与、針無しの注射および針無しの皮下投与)が挙げられ得る。

【0127】

本発明の1つの実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約300μmの間の直径を有する。本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約200μmの間の直径を有する。10
本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約100μmの間の直径を有する。
本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約10μmの間の直径を有する。
本発明の最も好ましい実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約5μmの間の直径を有する。
本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約1μmの間の直径を有する。
本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約999nmの間の直径を有する。
20
本発明の別の実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPは、約0.04μm～約499nmの間の直径を有する。

【0128】

本発明に従う球状ナノクリスタル複合粒子の好ましい実施形態において、この粒子は、直径約1μm～約300μmであり、そして約40nm～約999nmの直径を有するタンパク質ナノクリスタルを含む。本発明に従うナノクリスタル複合粒子の最も好ましい実施形態は、この球状ナノクリスタル複合粒子が、直径、約1μm～約300μmであり、そして約40nm～約499nmの直径を有するタンパク質ナノクリスタルを含むことである。

【0129】

本発明の1つの実施形態において、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを含む組成物(処方物を含む)は、溶液中で約1mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約10mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約20mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約50mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約100mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約120mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約200mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。あるいは、本発明の組成物(処方物を含む)は、溶液中で約400mg/mlより高いタンパク質濃度を有する。30
40

【0130】

本発明に従い、任意の個体(ヒト、動物および植物を含む)が、薬学的有効量の生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそのようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPPを含む組成物もしくは処方物を用いて、幾分かの期間にわたりそれらが投与される個体における状態を処置するのに十分な期間にわたり、薬学的に受容可能な様式で処置され得る。あるいは、個体は、幾分かの期間にわたり予防有効量の生物学的に活性なSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそのようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPPを含む組成物もしくは処方物が投与される個体における状態を予防するため有効である、それらの粒子または組成物もしくは処方物を受容し得る。50

【0131】

生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物が、単独でか、薬学的な、個人医療用もしくは獣医学的な調製物の一部としてか、個人的医療用もしくは獣医学的な調製物としてか、または予防的調製物の一部として、アジュバンドと共にか、またはそれを伴わずに投与され得る。これらは、非経口経路または経口経路により投与され得る。例えば、これらは、経口経路、経腸経路、経鼻腔経路、経耳経路、経肛門経路、経皮(dermal and transdermal)経路、経眼経路、経静脈経路、筋肉内経路、経大動脈経路、経腹膜経路、経粘膜経路、舌下経路、皮下経路、経皮経路または経頭蓋経路により投与され得る。薬学的、個人医療用または獣医学的な適用のいずれかにおいて、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらの組成物もしくは処方物は、任意の上皮表面に局所投与され得る。そのような上皮表面としては、口腔表面、眼の表面、耳の表面、肛門表面、および鼻腔表面が挙げられ、これらは、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらの組成物もしくは処方物の適用により、処置、保護、修復または解毒され得る。

10

【0132】

生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物を含む薬学的、獣医学的、または予防的な組成物または処方物はまた、錠剤、リポソーム、顆粒剤、球体、微粒子、微小球体、エアロゾルおよびカプセル剤からなる群より選択され得る。

20

【0133】

本発明に従うそのような使用、および他の使用において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物は、錠剤へと処方され得る。そのような錠剤は、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物の貯蔵のための、液体を含まず、粉塵を含まない形態から構成され、それらは、容易に扱われ、そして受容可能なレベルの活性または能力を維持する。

20

【0134】

あるいは、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物は、反応性の組成物または処方物を提供するための投与のために利用される種々の従来の形態で用いられ得る。これらとしては、例えば、固体、半固体および液体(例えば、液体状溶液または懸濁液)、スラリー、ゲル、クリーム、香油、エマルジョン、ローション、散剤、スプレー剤、フォーム、ペースト、軟膏剤(ointment)、軟膏剤(salve)、香油および滴下剤の投薬形態が挙げられる。

30

【0135】

生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶SPP、またはそれらを含む組成物もしくは処方物はまた、薬学的、個人医療用の組成物もしくは処方物または獣医学的な組成物もしくは処方物において使用される、任意の従来のキャリアまたはアジュバントを含み得る。これらのキャリアおよびアジュバントとしては、例えば、フロイントアジュバント、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、緩衝物質(例えば、ホスフェート)、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、植物性飽和脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩または電解質(例えば、硫酸プロタミン)、リン酸水素二ナトリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、マグネシウム、トリシリケート、セルロースベース物質およびポリエチレングリコールが挙げられる。局所形態およびゲルベースの形態のためのアジュバントとしては、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよびウッドワックスアルコール(wood wax alcohol)が挙げられ得る。

40

【0136】

50

生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物の投与および投薬レジメンの最も有効な様式は、所望の効果、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の投与の結果、もしあれば以前の治療、個体の健康状態または状態 (condition) 自体の状態 (status) および生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物に対する応答、ならびに処置する医師または臨床家の判断に依存する。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物は、一度にまたは一連の処置にわたって、医薬品、免疫療法、または獣医学的な組成物または処方物に受容可能な任意の投薬形態で投与され得る。

10

【0137】

生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物の量（単一投薬を提供する）は、投与の特定の様式、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらの組成物または処方物の特定のタイプ、ならびに用量レベルまたは投薬頻度に依存して変化する。代表的な調製物は、約 0.01% と約 99% の間、好ましくは、約 1% と約 50% の間の生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP (w/w) を含む。あるいは、調製物は、約 0.01% と約 80% の間の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、好ましくは、約 1% と約 50%との間の生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP (w/w) を含む。

20

【0138】

個体の状態の改善において、生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物の維持用量が、必要に応じて投与され得る。引き続いて、投与の投薬量または頻度、あるいはその両方が、症状の関数として、改善された状態が保持されるレベルまで減少され得る。状態が所望のレベルに軽減した場合、処置は、やめるべきである。しかし、個体が、その状態または症状の任意の再発において、長期の基準で、断続的な処置を必要とし得る。

【0139】

本発明はまた、徐放性の方法論（例えば、シリコーンベースのリングまたはロッド（これは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物を予め装填され、従って、送達のための移植片として作用し得る））を利用し得る。この技術の目的は、週または月の期間にわたって、タンパク質の一定レベルを血流に提供することである。このような移植片は、皮内に挿入され得、そして必要な場合に、安全に取り出され、そして置換され得る。

30

【0140】

本発明に従う他の組成物または処方物は、抗原性タンパク質、アジュバント、および必要に応じてカプセル化ポリマーの SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP を含むワクチン組成物または処方物を含む。本発明の 1 つの実施形態において、インタクトな抗イディオタイプ抗体自体は、免疫原であり、従って、目的は、インタクトな抗体の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物が、抗イディオタイプが模倣するかまたは密接に関連する抗原に対する応答を誘発することである。従って、抗イディオタイプ抗体は、癌および自己免疫疾患（例えば、アレルギー）ならびに B 型肝炎ウイルスのようなウイルスに対するある型のワクチンまたは治療法として作用し得る。

40

【0141】

このような組成物または処方物の 1 つの実施形態は、3 つ以上の異なる放出プロフィールを有するミクロスフェアを含む單一ワクチン注射を含む。この方法において、タンパク質抗原、または抗原に類似して作用する抗イディオタイプ抗体の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP は、持続する免疫性を形成するのに十分な持続時間にわた

50

って放出され得る。この組成物または処方物によって、複数の抗原ブーストが、単一単位形態で可能であり得る。このような系の1つの利点は、抗原性タンパク質、または抗原に類似して作用する抗イディオタイプ抗体のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを使用することによって、抗原のネイティブな3次元構造が維持され、そしてそれらのネイティブな形態で免疫系に提示されることである。

【0142】

一旦、免疫系がプライムされると、アジュバント効果についてあまり必要でなくても良い。従って、ゆっくり分解する接種物において、あまり免疫原性でないアジュバントが含まれ得、おそらく、組成物または処方物の最もゆっくり分解するミクロスフェアにおいては必要とされなくて良い。この方法において、遠隔領域における患者集団は、感染性疾患に対する保護を提供するために、複数回処置されなければならないという必要がない。タンパク質抗原、または抗原のように作用する抗イディオタイプ抗体の生物学的送達分野の当業者は、このテーマについて多くの変更が実施可能であることを理解する。

【0143】

本発明の別の利点は、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物が、凍結乾燥によって乾燥され得ることである（実施例26、方法3を参照のこと）。凍結乾燥（lyophilization）または凍結乾燥（freeze-drying）によって、水が組成物または処方物から分離され得る。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物は、最初に凍結され、次いで、高真空に置かれる。真空において、結晶性H₂Oは昇華し、強固に結合した水のみを含む、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらの組成物または処方物をインタクトなままで残す。このような処理は、さらに、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらの組成物または処方物を安定化し、そして代表的に遭遇する周囲温度において、より簡単な貯蔵および輸送を可能にする。

【0144】

本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPはまた、噴霧乾燥され得る（実施例26、方法6を参照のこと）。噴霧乾燥によって、水が、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらの組成物または処方物から分離され得る。これは、溶液、エマルジョン、およびポンプ輸送可能懸濁液のような液体フィードストックから、粉末、顆粒または凝集塊のいずれかの形態で乾燥固体を連続製造するために特に適する。噴霧乾燥は、液体フィードストックの液滴の噴霧への微粒化、および乾燥チャンバにおけるこの液滴と熱空気との接触を包含する。噴霧は、ロータリー（ホイール）またはノズル噴霧器のいずれかによって製造される。液滴からの水分のエバボレーションおよび乾燥粒子の形成は、制御された温度および気流条件下で進行する。比較的高い温度が、噴霧乾燥操作に必要である。しかし、生成物に対する熱損傷は、一般的に、ほんのわずかである。なぜなら、臨界乾燥時間の間にエバボレーションの冷却効果があり、そして引き続く、乾燥物質の高温への曝露の時間が、非常に短くあり得るからである。粉末は、乾燥チャンバから連続的に排出される。操作条件および乾燥機の設計は、生成物の乾燥特徴および粉末の仕様に従って選択される。噴霧乾燥は、粒子サイズ分布、残留水分含有量、バルク密度および粒子形状に関して、最終生成物が正確な品質基準に従う理想的なプロセスである。

【0145】

この特徴は、治療タンパク質およびタンパク質ワクチン（抗イディオタイプ抗体を含む）に特に望ましく、これは、単回用量滅菌容器（「アンプル」）あるいは任意の所望の增量の単回用量に、スラリーとして組成物または処方物中で、分配され得る。次いで、分配されたスラリーまたは組成物または処方物を含むアンプルは、滅菌条件下でキャップされ、バッチ凍結され、そして凍結乾燥され得る。このような滅菌容器は、世界中に輸送され得、そして周囲温度で貯蔵され得る。このようなシステムは、世界の遠隔部分および未開発部分に滅菌ワクチンおよび治療タンパク質を提供するために有用である。使用の点で、ア

10

20

30

40

50

ンブルは、選択された滅菌溶媒または滅菌緩衝液で再水和され、そして分配される。このような調製物について、最小の冷蔵が必要とされるかまたは冷蔵が必要でない。

【0146】

本発明のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPはまた、窒素乾燥（実施例26、方法1を参照のこと）、空気乾燥（実施例26、方法5）、有機溶媒の添加後の空気乾燥（実施例26、方法4）、または真空オープン乾燥（実施例26、方法2を参照のこと）され得る。

【0147】

本発明の別の実施形態において、本発明に従う生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、さらなる安定性のために架橋され得る。これによって、pH極限の領域（例えば、ヒトおよび動物の胃腸管）における、このようなSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはそれらを含む組成物または処方物の使用が可能である。例えば、生物学的に活性なタンパク質またはワクチンのSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP（例えば、モノクローナル抗体または抗イディオタイプ抗体のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP）は、以下を含むがこれらに限定されない種々の架橋剤のうちの1つを使用して架橋され得る：ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート・HCl（DTBP）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ビスマレイミド-ヘキサン（BMH）、ビス[スルホスクシンイミジル]スペレート（BS）、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（DFDNB）、ジメチルスベルイミデート（Dimethyl sulfoxime）・HCl（DMS）、ジスクシンイミジルグルタルート（DSG）、ジスルホスクシンイミジルターラート（Sulfo-DST）、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミド塩酸塩（EDC）、エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネット]（Sulfo-EGS）、N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル（GMB）_S、N-ヒドロキシスルホスクインイミジル-4-アジドベンゾエート（Sulfo-HSAB）、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート（Sulfo-LC-SMPT）、ビス-[b-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド（BASED）およびグルタルアルデヒド（GA）。

【0148】

本発明のさらなる実施形態において、タンパク質（例えば、インタクトな抗体または抗体のscFvフラグメント）のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、抗体放射線療法において使用されるように、放射標識され得る。このような治療において、例えば、放射標識された抗癌抗体またはscFvフラグメントを含むSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、またはそれらを含む組成物または処方物は、本発明に従って、癌の部位に送達され得る。送達後、放出された抗体またはscFvフラグメントは、その標的癌抗原に結合し、そして放射性同位体を癌性細胞または腫瘍に直接送達する。抗体の放出は、本発明に従って、時間を調節され得る。理論的に、有用な放射標識としては、以下の放射性同位体または放射性ヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない：³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I。しかし、実質的に、放射線療法におけるインビボの使用は、放射標識を、¹³¹I、⁹⁰Y、または短い半減期によって規定される任意の他の放射標識に制限する。例えば、モノクローナル抗体Rituximabは、非ホジキンリンパ腫を有する患者において、放射免疫療法で使用されるために、⁹⁰イットリウム（⁹⁰Y）で標識されている。この化合物は、Zevalin™（IDEC Pharmaceuticals, (San Diego, CA)）として市販される。

【0149】

（ポリマー性キャリアにおける生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPのカプセル化）

本発明の1つの実施形態に従って、処方物は、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球

10

20

30

40

40

状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが少なくとも1つのポリマー性キャリア中にカプセル化されて、ポリマー性キャリアのマトリクス内にカプセル化によってミクロスフェアを形成し、それらのネイティブかつ生物学的に活性な三次構造を保存する。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、異なる生物学的環境に送達するためまたは特定の機能をもたらすために適切な独特的な性質を有する種々の生体適合性および/または生分解性ポリマーを使用してカプセル化され得る。溶解速度および従って、活性タンパク質の送達の速度は、特定のカプセル化技術、ポリマー組成物、ポリマー架橋、ポリマー厚さ(thickness)、ポリマー溶解性、および抗体結晶形状によって決定される。

【0150】

10

カプセル化される、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、有機溶媒中に溶解されるポリマー性キャリア中に懸濁される。ポリマー溶液は、溶液に添加された後に、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを完全にコーティングするように十分に濃縮されなければならない。このような量は、約0.02～約20の間、好ましくは、約0.1～約2の間のポリマーに対するSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの重量比を提供する量である。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、約0.5分～約30分の間、好ましくは、約1分～約3分の間、溶液中でポリマーと接触される。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、それらがポリマーとの接触によってコーティングされる場合、懸濁を維持すべきであり、凝集させるべきではない

20

その接触の後、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、コーティングされ、そして発生期の(nascent)ミクロスフェアと呼ばれる。発生期のミクロスフェアは、コーティングが行われる間、サイズを増加する。本発明の好ましい実施形態において、懸濁された、コーティングされたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいは発生期のミクロスフェアは、ポリマー性キャリアおよび有機溶媒とともに、乳化剤として公知の界面活性剤を含むより大きな容積の水溶液に移される。水溶液において、懸濁された発生期のミクロスフェアは、水相に浸され、ここで、有機溶媒は、ポリマーからエバボレートされるかまたは拡散される。最終的に、ポリマーが、もはや可溶性でなく、そしてSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPをカプセル化して、処方物を形成する沈殿相を形成する点に達する。このプロセスのこの局面は、ポリマー性キャリアまたはポリマーの硬化と呼ばれる。乳化剤は、このプロセスの硬化相の間、システムにおいて種々の物質相の間の界面張力を減少させるのに役立つ。あるいは、コーティングポリマーは、いくらか固有の表面活性を有する場合、別の表面活性剤の添加のために必要でなくても良い。

30

【0151】

本発明に従う、生物学的に活性なタンパク質のカプセル化したSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを調製するために有用な乳化剤としては、ポリ(ビニルアルコール)(本明細書中において例示される)、界面活性剤、およびポリマーコーティングされたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPと溶液との間の表面張力を減少させ得る他の表面活性剤が挙げられる。

40

【0152】

本発明の好ましい実施形態において、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの結晶化度は、カプセル化処理の間、維持される。結晶化度は、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが可溶性でない有機溶媒を使用することによって、コーティングプロセスの間、維持される。引き続いて、一旦、コーティングされた球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、水性溶媒に移され、ポリマー性キャリアが迅速に硬化し、そして先の工程における球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの十分なコーティングが、結晶性物質の溶解を防ぐ。

【0153】

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPをコーティングするためにポリ

50

マー性キャリアとして使用されるポリマーは、ホモポリマーまたはコポリマーのいずれかであり得る。ミクロスフェアの加水分解速度は、個々のポリマー種の加水分解速度によって大部分が決定される。一般的に、加水分解の速度は、以下のように減少する：ポリカルボネート > ポリエステル > ポリウレタン > ポリオルトエステル > ポリアミド。生分解性および生体適合性ポリマーの総説について、W. R. Gombotz および D. K. Pettit、「Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery」、Bioconjugate Chemistry、第6巻、332～351頁(1995)を参照のこと。

【0154】

本発明の好ましい実施形態において、ポリマー性キャリアは、単一のポリマー型(例えば、PLGA)を含む。次に好ましい実施形態において、ポリマー性キャリアは、ポリマーの混合物(例えば、50% PLGA および 50% アルブミン)であり得る。 10

【0155】

本発明に従って、生物学的に活性なタンパク質のカプセル化されたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを調製するために、ポリマー性キャリアとして有用な他のポリマーとしては、以下が挙げられる：ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペブチド)、ポリ(エステル)(例えば、ポリ(乳酸)またはPLA)、ポリ(b-hydroxybutyrate)、ポリ(カプロラクトン)およびポリ(ジオキサン)；ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテルコポリマー、フルロニック(pluronic)ポリオール、アルブミン、アルギメント、セルロースおよびセルロース誘導体、デンプンおよびその誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸多糖類、これらのブレンドおよびコポリマーからなる群より選択される生体適合性/生分解性ポリマー。他の有用なポリマーは、J. Heller および R. W. Balar, 「Theory and Practice of Controlled Drug Delivery from Biodegradable Polymers」、Academic Press, New York, NY, (1980)；K. O. R. Lehmann, H. M. Bossler および D. K. Dreher, Biol. Macromol. Monog., 第5巻、111～19頁(1979)；E. M. Ramadan, A. El-Helw および Y. El-Said, Journal of Microencapsulation, 第5巻、125頁(1988)に記載される。好ましいポリマーは、使用されるSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの特定のタンパク質成分、およびカプセル化されるSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの意図される使用に依存する。あるいは、溶媒エバボレーション技術は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPをカプセル化するために使用され得る(D. Babay, A. Hoffmann および S. Benita, Biomaterials, 第9巻、482～488頁(1988)を参照のこと)。 20 30 40

【0156】

本発明の好ましい実施形態において、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、ポリマー(例えば、ポリ乳酸-コ-グリコール酸)を用いて本明細書中に示されるような二重エマルジョン法を使用して、少なくとも1つのポリマー性キャリアにカプセル化される。本発明の最も好ましい実施形態において、ポリマーは、ポリ乳酸-コ-グリコール酸(「PLGA」)である。PLGAは、乳酸(「L」)およびグリコール酸(「G」)とのポリ縮合反応によって調製されるコポリマーである。種々の割合のLおよびGを使用して、PLGAポリマーの結晶性および疎水性を調節し得る。ポリマーのより高い結晶性は、より遅い溶解を生じる。20～70%のG含量を有するPLGAポリマーは、非晶質性固体である傾向があるが、より高いレベルのG 50

またはLのいずれかは、よいポリマー結晶性を生じる。D. K. GildingおよびA. M. Reed, "Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 1., Polymer vol. 20, pp. 1459 - 1464 (1981) を参照のこと。PLGAは、水への曝露後にエステル結合の加水分解によって分解して、乳酸およびグリコール酸の非毒性のモノマーを生じる。

【0157】

本発明の別の実施形態は、二重壁のポリマー被覆ミクロスフェアを含む。二重壁のポリマー被覆ミクロスフェアは、塩化メチレン、またはポリマーを溶解し得る他の溶媒中に、2つの別々のポリマー溶液を調製することによって生成され得る。生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPが、これらの溶液のうちの1つに添加され、そして分散される。ここで、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、第1のポリマーで被覆される。次いで、第1のポリマーに被覆されたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを含む溶液は、第2のポリマー溶液と合わせられる。[Pekarek, K. J.; Jacob, J. S. およびMathiowitz, E. Double-walled polymer microspheres for controlled drug release, Nature, 367, 258 - 260 (1994年1月20日) を参照のこと]。結果として、第2のポリマーは、結晶をカプセル化する第1のポリマーをカプセル化する。典型的には、この溶液は、次いで表面活性剤または乳化剤を含む多量の水溶液中に滴下される。この水溶液において、溶媒を、2つのポリマー溶液から蒸発させ、そしてポリマーを沈殿させる。

【0158】

本発明に従う組成物は、生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、および少なくとも1つの成分を含む。本発明に従う処方物は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPに添加される少なくとも1つの成分がポリマーである組成物である。

【0159】

本発明に従う生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、二次構造について特徴付けられ得る。より詳細には、このような生物学的に活性なタンパク質のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPは、約0.8~1.0の間のフーリエ変換赤外(FTIR)スペクトルによって決定される可溶性タンパク質対照物のスペクトルと比較した相関スペクトルによって示されるような、-シートまたは-ヘリックス構造含量によって特徴付けられ得る。約0.8未満の相関係数は、その二次構造含量がネイティブな生物学的に活性なタンパク質と比較して約20%を超えて変化した程度にまで変性したタンパク質サンプルを示す。このことは、タンパク質の凝集および沈降を生じても、単に生物学的活性の喪失を生じてもよい。

【0160】

約0.8と1.0との間にある相関係数は、そのタンパク質サンプルがそのネイティブで可溶性の対照物の二次構造含量と約80%~約100%同一である二次構造含量を有することを示す。

【0161】

SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはこれらを含む組成物または処方物は、約4~約50で約4日間~約180日間の貯蔵の後に、そのタンパク質の-ヘリックス構造含量を20%未満喪失することによって特徴付けられ得、ここで、このタンパク質の可溶性形態は、FTIRによって測定した場合、50で6時間の貯蔵の後にその-ヘリックス構造含量を50%より多く喪失する。あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP、あるいはこれらを含む組成物または処方物は、50で4日間の貯蔵の後にタンパク質の-ヘリックス構造含量を20%未満喪失することによって特徴付けられ、ここで、このタンパク質の可溶性形態は、FTIR

10

20

30

40

50

50

によって測定した場合、50で6時間の貯蔵の後にそのヘリックス構造含量を50%より多く喪失する。

【0162】

あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、ならびにこれらを含む組成物または処方物は、50で貯蔵した場合、T_{1,2}によって測定した場合、50の溶液中でのこのタンパク質の可溶性形態よりも少なくとも120倍高い貯蔵寿命によって特徴付けられ得る。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、ならびにこれらを含む組成物または処方物は、50で貯蔵した場合、T_{1,2}によって測定した場合、50の溶液中でのこのタンパク質の可溶性形態よりも少なくとも60倍高い貯蔵寿命によって代替的に特徴付けられ得る。あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、ならびにこれらを含む組成物または処方物は、50で貯蔵した場合、T_{1,2}によって測定した場合、50の溶液中でのこのタンパク質の可溶性形態よりも少なくとも30倍高い貯蔵寿命によって特徴付けられ得る。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、ならびにこれらを含む組成物または処方物は、50で貯蔵した場合、T_{1,2}によって測定した場合、50の溶液中でのこのタンパク質の可溶性形態よりも少なくとも10倍高い貯蔵寿命によって代替的に特徴付けられ得る。あるいは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPP、ならびにこれらを含む組成物または処方物は、50で貯蔵した場合、T_{1,2}によって測定した場合、50の溶液中でのこのタンパク質の可溶性形態よりも高い貯蔵寿命によって特徴付けられ得る。10

【0163】

あるいは、抗体を含むSPP、結晶性SPPまたは球状ナノクリスタル複合粒子の生物学的活性は、バイオイムノアッセイによって決定され得る。抗体の生物学的活性を測定するためのバイオイムノアッセイとしては、とりわけ以下に記載されるような、直接の細胞傷害性、補体依存的細胞傷害性(CDC)、および抗体依存的細胞媒介細胞傷害性(ADC)20Cが挙げられる。これらのアッセイは、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性抗体SPP由来の抗体の残存生物学的活性をこれらの可溶性抗体対照物と比較するために有用である。この方法において、抗体からSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを作製する効果、短期または長期の貯蔵、乾燥、および形成、ならびにその後のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子および結晶性SPPの組成物または処方物の溶解が、決定され得、そして問題の抗体の可溶性対照物と比較され得る。30

【0164】

その抗原を保有する標的細胞に対する抗体の細胞傷害性は、3つのアッセイ(例えば、直接の細胞傷害性、補体依存的細胞傷害性(CDC)、および抗体依存的細胞媒介細胞傷害性(ADCC))によって特徴付けられ得る。Rituxanについての標的細胞は、CD-20抗原をそれらの表面上に過剰発現する細胞であり、Raji、Daudi、JOK1およびWT100が挙げられる。Hercaptinについての特異的抗原は、HER2(ヒト上皮増殖因子レセプター-2タンパク質)であり、これは、ヒト胸部腺癌細胞株(SK-BR-3、BT474およびMCF/HER2が挙げられる)において過剰発現される。40

【0165】

好ましくは、抗体を含むSPP、結晶性SPPまたは球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約50%の生物学的活性を有する。より好ましくは、抗体を含むSPP、結晶性SPPまたは球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約60%の生物学的活性を有する。より好ましくは、抗体を含むSPP、結晶性SPPまたは球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約70%の生物学的活性を有する。より好ましくは、抗体を含むSPP、結晶性SPPまたは球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約80%の生物学的活性を有する。より好ましくは、抗体を含むSPP、結晶性SPP50

P または球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約 90 % の生物学的活性を有する。最も好ましくは、抗体を含む SPP、結晶性 SPP または球状ナノクリスタル複合粒子の溶解に由来するタンパク質抗体成分は、その可溶性抗体対照物の約 100 % の生物学的活性を有する。

【0166】

(球状の核酸粒子)

本発明の別の実施形態において、本明細書中に開示される方法は、核酸の球状粒子（すなわち、球状の核酸粒子（「SNAP」））を形成するために有用である。SNAP は、ワクチン抗原として DNA ワクチンの開発に有用であり得る。SNAP はまた、遺伝子治療ストラテジーにおける遺伝子の送達に有用であり得る。

10

【0167】

(生物学的に活性なタンパク質の、カプセル化した SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の安定性)

当業者は、タンパク質の安定性は、タンパク質の放出を制御するポリマー微粒子送達系の首尾よい処方に対する最も重要な障壁の 1 つであることを理解する。ポリマーキャリア中にカプセル化された生物学的に活性なタンパク質の SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP のタンパク質安定性は、3 つの別々の段階で調べられ得る：SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の組成物または処方物の製造；得られた SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の組成物または処方物からのタンパク質の放出；および、このタンパク質放出の後のインビボでの安定性。可溶性タンパク質または非晶質タンパク質を含む微粒子またはミクロスフェアの調製の間、有機溶媒および凍結乾燥の使用は、タンパク質安定性に対して特に有害である。続いて、放出されたタンパク質は、水分誘導性凝集に感受性であり、よって恒久的不活性化を生じる。

20

【0168】

本発明に従って SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の組成物または処方物を調製する間に高いタンパク質安定性を獲得するために、個々の生物学的に活性なタンパク質分子の可動性（SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の使用を介して達成し得る結果）を制限することが、必要である。

【0169】

(処方物を作製するときの SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の形態、結晶性および安定性の維持)

30

本発明に従ってタンパク質処方物を調製するためのタンパク質供給源として SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP を使用するために、透析手順の間に使用される母液の外での SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の溶解の問題は、克服されなければならなかった。処方物の生成において使用される SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の形態および / または結晶性および / または安定性を維持するために、いくつかのアプローチが使用され得る：

1. 本発明に従って SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の生成に使用される多くの化合物は、ポリマー処理条件と両立可能であり、それ故、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の処方物を作製する際に含まれ得る。これらとしては、とりわけ、塩、有機溶媒、金属および PEG が挙げられる。

40

2. 乾燥した SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP : 調製用緩衝液（すなわち、母液）は、濾過によって除去され得、そして残存「ペースト」は、減圧下で空気によって、水混和性有機溶媒で洗浄することによって、および / または凍結乾燥もしくはスプレー乾燥によって、乾燥され得る。

3. SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP のサイズは、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の処方物を調製する過程において操作および制御され得る。従って、ある範囲のサイズが利用可能であり、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 SPP の処方物を使用して被験体にタンパク質を送達する場合、それぞれのサイズが、異なる溶解動力学、その後の異なる徐放性プロフィールを付与する

50

。

【0170】

(抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPを処方する間の抗体凝集物の除去)

凝集は、抗体調製においてしばしば遭遇する重大な問題であり、そしてこのような抗体調製物を受ける患者において有害な効果を生じ得る。本発明の別の実施形態において、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶性抗体SPPを処方するプロセスは、抗体調製の間に形成し得る抗体凝集物を除去する(実施例13を参照のこと)。

【実施例】

【0171】

本発明がよりよく理解され得るために、以下の実施例が記載される。これらの実施例は、例示のみの目的のためであって、任意の様式において本発明の範囲を限定するように解釈されるべきではない。

【0172】

(実施例1)

(Infliximabの球状タンパク質粒子の調製)

Infliximabは、RemicadeTM (Centocor, Leiden, the Netherlands)として市販されるマウス/ヒトキメラモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体は、慢性関節リウマチおよびクローン病を処置するために広範に使用されている。Infliximabは、TNF抗原に結合するキメラIgG1免疫グロブリンである。これは、マウス軽鎖可変領域配列およびマウス重鎖可変領域配列ならびにヒト定常領域配列から構成される。Infliximab抗体は、149kDのおよその分子量(MWt)を有する。

【0173】

(Infliximab SPP調製物)

(材料:)

Infliximab抗体(各バイアルは、100mg Infliximab、500mgスクロース、0.5mgポリソルベート80、2.2mg一塩基性リン酸ナトリウムおよび6.1mg二塩基性リン酸ナトリウムを含む)は、10mlの水(pH約7.2)中で再構成した(濃度は、10mg/mlに等しい)。

【0174】

(手順:)

Infliximab SPPを、Slide-A-Lyzer(Pierce Chemicals, カタログ番号69570)を以下のように使用して形成した:

[Slide-A-Lyzerを使用する透析:]

A. 本実施例で使用されるSlide-A-Lyzerは、10kDに分子量カットオフ点を有した。

B. 手順:

1. Slide-A-Lyzer膜単位を、蒸留水中に一晩浸した。

2. 小さなCentriconチューブ(Amicon, カタログ番号4208)の下部分を、3.8~3.9mlの適切な緩衝液(Infliximab用、以下を参照のこと)で充たした。

3. 3.5mm×3.5mmの磁気攪拌バーを使用して、Centriconデバイスの下部分中の溶液を攪拌した。

4. 150~410μlの所望のタンパク質溶液(本実施例については、Infliximab)(約10~20mg/mlに等しいタンパク質濃度)を、Slide-A-Lyzer装置に加えた。緩衝溶液のレベルの1mmまたは2mm下になるように、適切な膜ユニットを、Slide-A-Lyzer装置に置き、そしてキャップを、蒸発を防ぐよう十分堅くSlide-A-Lyzerユニット上に置いた。

5. 次いで、緩衝液/タンパク質混合物を適切な温度で適切な時間の間透析した。

10

20

30

40

50

6. 透析後、HPLC および顕微鏡検査を使用して、SPP の存在または非存在を決定し、上清のタンパク質含量を、280 nm の光学濃度 (OD₂₈₀) で吸光度を測定することによって決定した。SPP を、適切な時点で回収した。

[Infliximab SPP の処方 :]

Infliximab の 10 mg / ml 溶液 150 μl を、2.1 M 硫酸アンモニウム、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.8)、1% プロピレングリコールから構成される 3.9 ml の溶液に対して透析した。(Slide-A-Lyzerにおいて) 10,000 MW カットオフ透析膜を使用した。混合物を、室温で 28 時間透析した。次いで、このタンパク質溶液を、2.42 M 硫酸アンモニウム、1% プロピレングリコール、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.8) からなる 800 μl の溶液中で 2 回洗浄し、遠心分離し、そして約 200 μl の同一の溶液中に再懸濁した。 10

【 0175 】

(結果 :)

Infliximab SPP は、28 時間後に形成した。図 1A を参照のこと。

【 0176 】

(実施例 2)

(Rituximab の球状タンパク質粒子の調製)

Rituximab は、RituxanTM (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) として市販されるマウス / ヒトキメラモノクローナル抗体である。このモノクローナル抗体は、非ホジキンリンパ腫を処置するために広範に使用されている。Rituximab は、正常および悪性の B リンパ球表面上の CD 20 抗原に結合するキメラ IgG1 免疫グロブリンである。これは、マウス軽鎖可変領域配列およびマウス重鎖可変領域配列ならびにヒト定常領域配列から構成される。Rituximab 抗体は、145 kD のおよその分子量 (MWt) を有する。 20

【 0177 】

(Rituximab SPP 調製物)

(材料 :)

Rituximab 抗体 (9.0 mg / ml 塩化ナトリウム、7.35 mg / ml 無水クエン酸ナトリウム、0.7 mg / ml ポリソルベート 80 および滅菌水 (pH 6.5) 中 10 mg / ml で、4°にて使用するまで貯蔵した) 30

(手順 :)

Infliximab について上記した方法 (実施例 1) に従って、10,000 MW カットオフ Slide-A-Lyzer を使用して、Rituximab SPP を形成した。

【 0178 】

Rituximab の 5 ~ 10 mg / ml 溶液 100 μl を、2.1 M 硫酸アンモニウムと 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.8) と 1% プロピレングリコールとからなる溶液 3.9 ml に対して透析した。10,000 MW カットオフ透析膜を使用した。その混合物を、室温にて 28 時間透析した。その後、そのタンパク質溶液を、2.42 M 硫酸アンモニウムと、1% プロピレングリコールと 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 5.8) とからなる溶液 800 μl 中で 2 回洗浄し、遠心分離し、そして同じ溶液約 200 μl 中に再懸濁した。 40

【 0179 】

(結果)

Rituximab SPP が、28 時間後に形成した。図 1B を参照のこと。

【 0180 】

(実施例 3 Trastuzumab の球状タンパク質粒子の調製)

Trastuzumab は、HerceptinTM (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) として市販されている、モノクローナル抗体である。 50

【0181】

(Trastuzumab SPP調製)

(材料)

1ml水(22mg/ml)(pH6)中に再構成した、Trastuzumab抗体(22mgのTrastuzumabと、1mgのL-ヒスチジンHC1と、0.64mgのL-ヒスチジンと、40mgトレハロース二水和物と、0.18mgポリソルベート20とを含む、凍結乾燥粉末として入手可能)。

【0182】

(手順)

Trastuzumab SPPを、実施例1について上記した方法に従って10,000MWカットオフSlide-A-Lyzerを使用して、形成した。

【0183】

100μlのTrastuzumab溶液(22mg/mlのTrastuzumab)を、2.1M硫酸アンモニウムと0.1M酢酸ナトリウム(pH5.8)と1%プロピレングリコールとからなる溶液3.9mlに対して透析した。10,000MWカットオフ透析膜を使用した。その混合物を、室温にて28時間透析した。その後、そのタンパク質溶液を、2.42M硫酸アンモニウムと、1%プロピレングリコールと0.1M酢酸ナトリウム(pH5.8)とからなる溶液800μl中で2回洗浄し、遠心分離し、そして同じ溶液約200μl中に再懸濁した。

【0184】

(結果)

Trastuzumab SPPが、28時間後に形成した。図1Cを参照のこと。

【0185】

(実施例4 Etanerceptの球状タンパク質粒子の調製)

Etanerceptは、EnbrelTM(Immunex, Seattle, WA)として入手可能な、モノクローナル抗体である。

【0186】

(Etanercept SPP調製)

(材料)

Etanercept抗体(40mgマンニトールと、10mgスクロースと、1.2mgトロメタミンとを含む溶液中)。

【0187】

(手順)

Etanercept SPPを、実施例1について上記した方法に従って10,000MWカットオフSlide-A-Lyzerを使用して、形成した。25mg/mlのEtanercept溶液(40mgマンニトールと、10mgスクロースと、1.2mgトロメタミンとを含む)の200μlアリコートを、2.31M硫酸アンモニウムと0.1M酢酸ナトリウム(pH5.8)と1%プロピレングリコールとからなる溶液3.9mlに対して透析した。10,000MWカットオフ透析膜を使用した。その混合物を、4にて28時間透析した。その後、そのタンパク質溶液を、2.62M硫酸アンモニウムと、1%プロピレングリコールと0.1M酢酸ナトリウム(pH5.8)とからなる溶液800μl中で2回洗浄し、遠心分離し、そして同じ溶液約200μl中に再懸濁した。

【0188】

(結果)

Etanercept SPPが、28時間後に形成した。

【0189】

(実施例5 Etanerceptの球状タンパク質粒子の調製、番号2)

(Etanercept SPP調製、方法2)

(材料)

20

40

50

E tan e r c e p t S P P を、実施例 1 について上記した方法に従って 10 , 000 MW カットオフ S l i d e - A - L y z e r を使用して、形成した。E tan e r c e p t 抗体 (40 mg マンニトールと、10 mg スクロースと、1.2 mg トロメタミンとを含む溶液中)。

【0190】

(手順)

25 mg / ml の E tan e r c e p t 溶液 25 μl を、6 M 蟻酸ナトリウム (pH 7.5) からなる溶液 3.9 ml に対して透析した。10 , 000 MW カットオフ透析膜を使用した。その混合物を、4 にて 28 時間透析した。その後、そのタンパク質溶液を、6.5 M 硫酸アンモニウムからなる溶液 800 μl 中で 2 回洗浄し、遠心分離し、そして同じ溶液約 100 μl 中に再懸濁した。

【0191】

(結果)

E tan e r c e p t S P P が、28 時間後に形成した。

【0192】

(実施例 6 R it u x i m a b の球状タンパク質粒子の調製、番号 2 : 非透析法)

(R it u x i m a b S P P 調製)

(材料)

R it u x i m a b 抗体 (9.0 mg / ml 塩化ナトリウムと、7.35 mg / ml クエン酸ナトリウム無水物と、0.7 mg / ml ポリソルベート 80 と滅菌水 (pH 6.5) との中に、10 mg / ml にて、使用するまで 4 で保存した)。

【0193】

(手順)

4 M 硫酸アンモニウムのアリコートを、10 mg / ml の R it u x i m a b 溶液 200 μl に添加し、濃度を段階的に 0.2 M ずつゆっくり増加させ、0.5 M から始めて 2.2 M まで増加させた。その混合物を、各濃度にて 1 時間平衡化させた。サンプルを顕微鏡によって定期的に分析して、球状形成を測定した。タンパク質含量、収率、および上清中に残ったタンパク質の量を、光学密度 (OD) 280 nm の分光光度計および HPLC によって測定した。

【0194】

(結果)

R it u x i m a b S P P が形成した。

【0195】

(実施例 7 アルブミン S P P の調製)

アルブミン S P P を、蒸気拡散懸滴物から得た。

【0196】

(方法)

アルブミンの (水中) 200 mg / ml ストック溶液のアリコートを、0.05 M リン酸二水素カリウム (pH 5.5) と 20 % (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 8000 との溶液と 1 : 1 の比で混合し、プラスチックカバーガラス上に配置した。0.05 M リン酸二水素カリウム (pH 5.5) と 20 % (w/v) PEG 8000 とを含むレザバ溶液 1 ml を、24 ウエル Linbro プレート (ICN Biomedicals, Inc.) のウェル (レザバ) 中に配置した。その後、そのカバーガラスを、Linbro プレートのウェル (レザバ) の上に反転させ、そして真空グリースで密封した。その後、懸滴溶液を、レザバ溶液とゆっくり平衡化させた。

【0197】

(結果)

アルブミン S P P が、この懸滴において一晩で形成した。

【0198】

(実施例 8 ポリエチレングリコール (PEG) を使用する球状タンパク質粒子、球状ナ

10

30

40

50

ノクリスタル複合粒子または結晶SPPの調製)

この実施例は、種々のタンパク質(特に、酵素(例えば、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ)、タンパク質ホルモン(例えば、ヒト成長ホルモン)、ウイルス、ウイルスタンパク質、抗体(例えば、*Infl iximab*、*Rituximab*、*Trastuzumab*)、抗体フラグメント、レセプター、およびペプチド(例えば、カルシトニン)が挙げられる)のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを調製する方法を示す。

【0199】

(手順)

分子量2000～8000の40%PEGのアリコートを、200μlのタンパク質溶液(溶液1mlあたり5～20mgタンパク質)に添加し、濃度を、4%PEGから開始して1%ずつ段階的にゆっくり増加させ、16.5%PEGまで段階的に増加させる。この混合物を、各濃度にて1時間平衡化させる。サンプルを、顕微鏡により定期的に分析して、球状形成を測定する。その上清中のタンパク質含量、収量、および残っているタンパク質の量を、光学密度(OD)280nmの分光光度計およびHPLCによって測定する。

【0200】

(実施例9 PEG-モノメチルエーテル(PEG-ME)を使用する球状タンパク質粒子、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの調製)

この実施例は、種々のタンパク質(特に、酵素(例えば、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ)、タンパク質ホルモン(例えば、ヒト成長ホルモン)、ウイルス、ウイルスタンパク質、抗体(例えば、*Infl iximab*、*Rituximab*、*Trastuzumab*)、抗体フラグメント、レセプター、およびペプチド(例えば、カルシトニン)が挙げられる)のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを調製する方法を示す。

【0201】

(手順)

分子量3350の40%PEGモノメチルエーテル(PEG-ME)のアリコートを、200μlのタンパク質溶液(溶液1mlあたり5～20mgタンパク質)に添加し、濃度を、4%PEGを超えて12%PEGまで1%ずつ段階的にゆっくり増加させる。この混合物を、各濃度にて1時間平衡化させる。サンプルを、顕微鏡により定期的に分析して、球状形成を測定する。その上清中のタンパク質含量、収量、および残っているタンパク質の量を、光学密度(OD)280nmの分光光度計およびHPLCによって測定する。

【0202】

(実施例10)

上記に例示したSPP調製法、球状ナノクリスタル複合粒子調製法、または結晶SPP調製法を、硫酸アンモニウム以外、ギ酸ナトリウム以外、PEG以外、およびPEG-ME以外の緩衝液(特に、硫酸リチウムおよびMPDが挙げられる)を使用して実行し得る。

【0203】

(実施例11 SPPの調製による乳汁タンパク質からの*Infl iximab*、*Rituximab*、および*Trastuzumab*の選択的分画/精製)

この実施例は、SPPの調製によって*Infl iximab*、*Rituximab*および*Trastuzumab*を分画/精製する方法を包含する。この方法は、他の多数のタンパク質(特に、酵素(例えば、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ)、タンパク質ホルモン(例えば、ヒト成長ホルモン)、ウイルス、ウイルスタンパク質、抗体、抗体フラグメント、レセプター、およびペプチド(例えば、カルシトニン)が挙げられる)を精製するために使用し得る。

【0204】

(材料)

10

20

30

40

50

生乳を、地方牧場 (Crystal Brook Farm, Sterling, MA) から購入し、4にて保存した。

【0205】

(手順)

100 ml の乳汁アリコートを、2つの50 ml 遠心管に移し（各50 ml）、4にて9500 rpmで15分間の遠心分離によって脱脂肪した。そのクリーム層に、銳利なピペットチップを使用して穿刺し、その脱脂乳を、清浄なチューブにそのチューブの開口部を通してデカントした。その後、その脱脂乳を再遠心分離（4にて9500 rpmで15分間）してすべての残留脂肪を除去した。その後、等容量の250 mM EDTAを添加することによって、その脱脂乳を清澄化した。その乳状の外観が清浄になった。これは、ミセル状構造および凝集物の破壊を示す。その後、EDTA清澄化脱脂乳の各々50 ml のアリコートを、4にて、1リットルのリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）に対して透析して、EDTAを除去した。その後、その透析後の溶液を、10,000 rpmにて20分間遠心分離し、その後、0.2 μm フィルターを通過させ、そしてタンパク質濃度についてアッセイした。その乳汁は、最終タンパク質濃度約7 mg / ml を有した。その後、その清澄化した乳汁の3つのアリコートを、等容量のストック Infliximab 溶液、ストック Rituximab 溶液、またはストック Trastuzumab 溶液でスパイクして、最終濃度約5~12 mg / ml タンパク質にした。清澄化した乳汁にスパイクしたその Infliximab タンパク質、Rituximab タンパク質、および Trastuzumab タンパク質の精製を、以下のように実施した。

10

20

20

【0206】

200 μl のタンパク質 / 清澄化乳汁溶液を、1.8 M 硫酸アンモニウムと、0.05 M 酢酸ナトリウム（pH 5.8）と、0.5% プロピレングリコールとからなる緩衝液 3.9 ml に対して、4にて18時間、10,000 MWカットオフを有する透析膜を使用して透析した。その後、18時間後に、そのタンパク質溶液を、1.8 M 硫酸アンモニウムと0.5% プロピレングリコールと0.05 M 酢酸ナトリウム（pH 5.8）とを含む溶液 800 μl 中で2回洗浄し、遠心分離し、同じ溶液約200 μl 中に再懸濁した。

【0207】

(結果)

Infliximab、Rituximab、およびTrastuzumabを、上記乳汁タンパク質から分画 / 精製した。図8を参照のこと。

30

【0208】

SPPを使用することに加えて、この実施例による方法を使用して、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの調製によってタンパク質を分画 / 精製し得る。

【0209】

(実施例12)

上記に例示したSPP調製条件、球状ナノクリスタル複合粒子調製条件、または結晶SPP調製条件は、臨床的に関連する任意のタンパク質にとって有用である。臨床的に関連するタンパク質は、使用されるべき治療領域によって分類し得る。そのようなタンパク質としては、市販のタンパク質が挙げられるがそれらに限定されず、そのような市販のタンパク質は、以下を包含するがこれらに限定されない、抗体を包含する：

40

(1) Abciximab (ReoproTM) : (抗 GPIIb / IIIa レセプター；心血管疾患の処置用)，(Centocor, Leiden, The Netherlands)、

(2) Palivizumab (SynagisTM) : (RSVにおける抗Fタンパク質；呼吸疾患) (MedImmune (Gaithersburg, MD)により製造)、

(3) Muromonab - CD3 (OrthocloneTM) : (抗CD3抗体；組織移植拒絶用) (Ortho Biotech, Raritan, NJ)、

(4) Gemtuzumab (MylotargTM) : (癌) (Wyeth Labs 50

, Philadelphia, PA)、

(5) Basiliximab (SimulectTM) : (抗CD25抗体；組織移植拒絶用) (Novartis, Basal, Switzerland)、

(6) Daclizumab (ZenapaxTM) : (抗CD25抗体；組織移植拒絶用) (Protein Design Labs, Fremont, CA)、

(7) Zevalin : (癌についての放射免疫療法) (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA)、

(8) MylotargTM : (抗CD33抗体)。

【0210】

(実施例13 抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子または結晶抗体SPPの形成の間の抗体凝集物の除去) 10

この実施例は、抗体調製物から抗体凝集物を除去するための方法を示す。SPPを形成するために使用される沈殿物（特に、硫酸アンモニウム、ギ酸塩、およびPEGを含む）はまた、より低濃度でタンパク質凝集物を除去するために役立つ。

【0211】

（手順）

凝集物を含む抗体溶液（10mg/ml抗体）を得る。サイズ排除クロマトグラフィーによってタンパク質凝集の程度を決定する。増加分において、2M硫酸アンモニウム、40%PEG（問題となるタンパク質に依存して、6.5%PEGまでの最終濃度にする）、または8Mギ酸塩（問題となるタンパク質に依存して、最終濃度約0.9Mにする）のいずれかのストック溶液を添加する。凝集したタンパク質は、最初に析出する。非凝集タンパク質は、溶液中に残る。ペレットと溶液との間のタンパク質分配を、HPLCによって追跡する。 20

【0212】

（実施例14 FTIRによる二次構造特徴決定）

以下の方法は、タンパク質の二次構造を測定するために特に有用である。詳細には、以下の方法を、アッセイされるタンパク質の -シート含量または -ヘリックス含量を測定するために使用し得る。このようにして、母液中に維持されるSPP、母液中に維持される球状ナノクリスタル複合粒子または母液中に維持される結晶SPPのタンパク質成分の二次構造、あるいは溶存するSPP、溶存する球状ナノクリスタル複合粒子または溶存する結晶SPPに由来するタンパク質の二次構造を、そのネイティブの可溶性対応物と比較し得る。このようにして、ネイティブの生物学的に活性なタンパク質に対する、例えば、1) SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを形成する効果、2) 短期保存または長期保存の効果、および3) SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの組成物もしくは処方物を生成することの効果を、決定し得る。 30

【0213】

相関係数を、Nicoletから得られるタンパク質分析ソフトウェアを使用して計算する。このタンパク質分析ソフトウェアは、以前に保存された参照スペクトルとそのタンパク質スペクトルとの間の相関係数の決定を容易に可能にする（Garland, B., FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States, Nicoletアトリケーションノート番号AN9479）。ネイティブの水性タンパク質の二次導関数スペクトルを、参照スペクトルとして使用する。乾燥SPP、乾燥球状ナノクリスタル複合粒子または乾燥結晶SPP、および凍結乾燥固体タンパク質を、サンプルとして使用し得る。それらのタンパク質は、相関係数が1に近づくにつれ、漸増的に類似する二次立体構造を有する。相関係数0.8未満によって、変性が示される。相関係数0.8未満は、1) 増加したネイティブタンパク質の -シート含量もしくは減少したネイティブタンパク質の -シート含量、または2) ネイティブタンパク質の -ヘリックス含量が、減少のみしている（すなわち、タンパク質の -シート含量は、変性の際に増加または減少し得るが、タンパク質の -ヘリックス含量は、変性の際に常に減少する）ことを示す。従つ 40

て、相関係数 0 . 8 未満は、アッセイされているタンパク質のネイティブの生物学的に活性な形態と比較した、そのタンパク質の変性に起因する二次構造の変化を示す。

【 0 2 1 4 】

相関係数 0 . 8 ~ 1 . 0 は、アッセイされているタンパク質の二次構造（すなわち、 - シート含量および / または - ヘリックス含量）が、そのタンパク質のネイティブの生物学的に活性な形態の二次構造と、約 8 0 % から約 1 0 0 % 同一であることを意味する。

【 0 2 1 5 】

(手順)

実施例 3 の方法に従って生成した Trastuzumab SPP、実施例 1 の方法に従って生成した Infliximab SPP、および実施例 2 の方法に従って生成した RituXimab SPP の各々の母液中で懸濁状態で維持される二次構造を、そのネイティブの可溶性対応物の二次構造と比較した。そのネイティブの可溶性抗体の懸濁状態の SPP のフーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトルを、Dongら [Dong, A., Caughey, B., Caughey, W. S., Bhat, K. S. および Coe, J. E. Biochemistry, 1992; 31: 9364 ~ 9370; Dong, A., Prestrelski, S. J., Allison, S. D. および Carpenter, J. F., J. Pharm. Sci., 1995; 84: 415 ~ 424.] により記載されるような Nicollect モデル 550 Magna シリーズ分光光度計にて収集した。その後、懸濁状態にある SPP の FTIR スペクトルを、それぞれのネイティブの可溶性対応物の FTIR スペクトルと比較した。

10

20

20

【 0 2 1 6 】

その相関係数を、Nicollect から得られるタンパク質分析ソフトウェアを使用して計算した。このタンパク質分析ソフトウェアは、以前に保存した参照スペクトルとそのタンパク質スペクトルとの間の相関係数の決定を容易に可能にする (Garland, B., FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States., Nicollect アプリケーションノート番号 AN 9479)。

【 0 2 1 7 】

(母液中の懸濁状態に維持された) 1 mlあたり約 10 mg SPP であるその SPP 溶液各々の 1 ml の FTIR スペクトルを、減衰反射法 (ATR) を使用して分析した。そのスペクトルを収集し、その後、アミド I 領域 ($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$) 下の二次導関数および曲線適合プログラムを使用して、二次構造の個々の成分の相対面積を決定するために、Grams 32 (Galactic Software, Salem, NH) を使用して処理した。

30

【 0 2 1 8 】

(結果)

ネイティブの可溶性 Trastuzumab と比較して、0 . 8 より大きい相関係数を、Trastuzumab SPP について得た。これは、Trastuzumab SPP を形成するプロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうものでもそのネイティブ構造を 2 0 % より大きく変化させるものでもなかったことを示す。これは、図 2 に示されるほぼ同一のスペクトルによって実証される。

40

【 0 2 1 9 】

ネイティブの可溶性 Infliximab と比較して、0 . 8 より大きい相関係数を、Infliximab SPP について得た。これは、Infliximab SPP を形成するプロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうものでもそのネイティブ構造を 2 0 % より大きく変化させるものでもなかったことを示す。これは、図 3 に示されるほぼ同一のスペクトルによって実証される。

【 0 2 2 0 】

ネイティブの可溶性 RituXimab と比較して、0 . 8 より大きい相関係数を、RituXimab SPP について得た。これは、RituXimab SPP を形成する

50

プロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうものでもそのネイティブ構造を20%より大きく変化させるものでもなかったことを示す。これは、図4に示されるほぼ同一のスペクトルによって実証される。

【0221】

この実施例に従うFTIR分析は、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのタンパク質成分として存在するすべてのタンパク質の二次構造を決定するために使用し得、ここで、そのSPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶SPPは、その母液中に維持されている。この実施例に従うFTIR分析は、溶存SPP、溶存球状ナノクリスタル複合粒子または溶存結晶SPPから得られるすべてのタンパク質のため、あるいは乾燥して固体サンプルにされたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのために、使用し得る。その固体サンプルのために、懸濁状態にあるタンパク質、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶SPPのために使用される減衰反射法(ATR)の代わりに、拡散反射法を使用する。固体サンプルのために、そのタンパク質を、350mgのKBr粉末を用いて軽く粉碎し、そして拡散反射アクセサリーのために使用する小さいカップ中に充填する。10

【0222】

(実施例15 抗体の生物学的活性の決定のためのバイオイムノアッセイ)

抗体の生物学的活性を、いわゆるバイオイムノアッセイによって特徴付けおよび測定し得、このバイオイムノアッセイとしては、特に、下記の3つのバイオイムノアッセイが挙げられる。これらのアッセイは、抗体SPP、球状ナノクリスタル複合抗体粒子、または結晶抗体SPPに由来する抗体の残留する生物学的活性を、その可溶性抗体対応物と比較するために有用である。このようにして、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶SPPを抗体から生成する効果と、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、および結晶SPPの組成物もしくは処方物を短期保存もしくは長期保存し、乾燥し、そして形成し、その後溶解する効果を、決定し得、そして問題となる抗体の可溶性対応物と比較し得る。20

【0223】

その抗原保有標的細胞に対する抗体の細胞傷害性を、これらのアッセイ(例えば、直接的細胞傷害性、補体依存性細胞傷害(CDC)、および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADC))によって特徴付け得る。Rituxanのとての標的細胞は、表面上にCD-20抗原を過剰発現する細胞であり、この細胞としては、Raji細胞、Daudi細胞、JOK1細胞およびWT100細胞が挙げられる。Hercaptinについての特異的抗原は、HER2(ヒト上皮増殖因子レセプター2タンパク質)であり、このHER2は、ヒト乳腺癌細胞株(SK-BR-3、BT474、およびMCF/HER2が挙げられる)において過剰発現される。30

【0224】

(実施例16 溶存したRituximab SPP由来のRituximabをネイティブの可溶性Rituximabと比較する、直接的細胞傷害性バイオイムノアッセイ)(直接的細胞傷害)

直接的細胞傷害は、その名前が暗示するように、標的細胞を種々の濃度の抗体と同時インキュベートすることによって、その標的細胞に対する抗体の固有の毒性効果を測定する。細胞生存を、抗体との同時インキュベーションの後に計数する。40

【0225】

(手順)

1) RAJIリンパ腫細胞(American Type Cell Collection(ATCC), Manassas, VA, ATCC番号CCL 86から得た)を、増殖培地で培養し、そして同じ増殖培地中に最終濃度 0.5×10^5 細胞/mlまで希釈した。

【0226】

2) 5000細胞($100 \mu l$)を、96ウェルアッセイプレートの各ウェルに移す。

【0227】

50

3) 別の 96 ウェルプレートにおいて、実施例 18 によって溶存 R ituximab SPP (実施例 2 の方法により生成した) から得た R ituximab、およびネイティブの可溶性 R ituximab を、細胞培養培地中で連続希釈した。

【 0228 】

4) その希釈した抗体溶液の 100 μl アリコートを、その細を含むアッセイプレートの各ウェルに移した。これによって、1 ウェルあたり 200 μl の抗体 / 細胞溶液の最終アッセイ溶液を得た。抗体を含まずに細胞を含むウェル (100 μl の増殖培地単独) を、コントロールとして使用した (「細胞のみ」コントロール)。そのプレートを、37 において 3 日間インキュベートした。

【 0229 】

5) 3 日間後、20 μl の Promega Substrate Cell Titter 96 Aqueous One Solution Reagent を、各ウェルに添加した。

【 0230 】

6) その後、490 nm の光学密度 (OD) を、37 にて読み取った。溶存 R ituximab またはそのネイティブの可溶性対応物を含むウェル中の 490 nm での吸光度を、「細胞のみ」コントロールと比較した。「細胞のみ」コントロールと比較した吸光度の減少は、RAJI リンパ腫細胞増殖阻害の指標であった。溶存 R ituximab SPP から得た R ituximab が RAJI リンパ腫細胞増殖を阻害する能力を、ネイティブの可溶性 R ituximab の能力と比較した。

【 0231 】

(結果)

実施例 18 によって溶存 R ituximab SPP から得た R ituximab は、RAJI リンパ腫細胞の直接的細胞傷害を誘導した。これは、同じ条件下でアッセイしたネイティブの可溶性 R ituximab 対応物に匹敵した。図 9 を参照のこと。

【 0232 】

(実施例 17 溶存した R ituximab SPP 由来の R ituximab をネイティブの可溶性 R ituximab と比較する、補体依存性細胞傷害 (CDC) バイオイムノアッセイ)

(補体依存性細胞傷害 (CDC))

補体依存性細胞傷害反応は、抗体がその細胞表面抗原に結合する場合に生じ、それによって、補体系 (細胞を溶解し局所的炎症反応を誘発する、一連の相互作用タンパク質) を活性化することによって標的細胞破壊を誘導する。

【 0233 】

(手順)

1) RAJI リンパ腫細胞 (American Type Cell Collection (ATCC), Manassas, VA, ATCC 番号 CCL 86 から得た) を、増殖培地中で培養し、そして同じ増殖培地中に最終濃度 0.5×10^5 細胞 / ml まで希釈した。

【 0234 】

2) 5000 細胞 (100 μl) を、96 ウェルアッセイプレートの各ウェルに移し、実施例 19 により溶存 R ituximab SPP (実施例 2 の方法により生成した) から得た R ituximab (25 μg / 細胞培養培地 1 ml)、またはネイティブの可溶性 R ituximab (25 μg / 細胞培養培地 1 ml) のいずれかと、種々の濃度のヒト血清との存在下で、培養した。抗体を含まずに細胞を含むウェルを、コントロールとして使用した (「細胞のみ」コントロール)。そのプレートを、37 において 3 日間インキュベートした。

【 0235 】

3) 3 日間のインキュベーション期間の後、生存する RAJI リンパ腫細胞の数を、Cell Titter 96 - Aqueous One Solution Proliger

10

20

30

40

50

ation Assay キット (Promega Corp., Madison, WI; Promega 製品番号 G3580) を使用して、各ウェルにおいて計数した。実施例 18 に従って溶存 Rituximab SPP から得た Rituximab を含むウェル中の生細胞の数を、ネイティブの可溶性 Rituximab を含むウェル中の生細胞の数および抗体を含まない細胞（「細胞のみ」コントロール）を含むウェル中の生細胞の数と、比較した。

【0236】

(結果)

図 10 を参照のこと。

【0237】

(実施例 18 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) バイオイムノアッセイ)

(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC))

CDC と類似して、ADCC は、モノクローナル抗体の細胞傷害を担う主要な機構のうちの 1 つである。CDC とは対照的に、ADCC により引き起こされる標的細胞破壊は、抗体がその標的細胞上の特異的抗原に結合した後に、免疫細胞を動員することによって開始される。この免疫細胞は、腫瘍細胞を特異的に攻撃する。この ADCC アッセイは、まず、ウェル / ブレートに固定量の標的細胞（腫瘍細胞）を播種すること、その後、抗体およびエフェクター免疫細胞（通常は、単離した末梢血単核細胞 (PBMC)）とともに同時にインキュベートすることによって、行う。その細胞生存を、同時インキュベーションの最後に測定する。コントロール（標的細胞 + 抗体のみ）の存在下と比較して、エフェクター免疫細胞の存在下では、細胞死は、有意に増加する。

【0238】

(手順)

末梢血単核細胞 (PBMC) を、健常血液ドナーの軟膜から調製する。その軟膜を、まず、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中に希釈する。そして、Boyumら (Scand. J. Clin. Lab. Invest. 補遺 97, 77~89 (1968)) の方法に従う Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心分離によって、PBMC を調製する。その細胞を、熱非働化ウシ胎仔血清 (FCS) と 10% ジメチルスルホキシドとを含む培地中に懸濁し、その後、等分にし、さらに使用するまで液体窒素中に凍結保存する。PBMC を融解し、同じ培地中で 3 回洗浄し、PBS 中で 1 回洗浄し、2 μM の赤メンブレン色素 PKH-26 (Sigma Chemical Co.) とともに 4 分間インキュベートする。その反応チューブを、室温にてわずかに攪拌する。

【0239】

リンパ腫細胞株（例えば、RAJI および DUADI (DSMZ, Braunschweig, Germany) を、プラスチックの 25 cm² 培養フラスコ (Greiner, Solingen, Germany) において、12.5 ml 培地中に対数増殖状態にて維持する。その細胞を採取し、PBS 中で洗浄し、2 μM の PKH-2（緑色蛍光）とともに 10 分間インキュベートする。FCS を添加することによって染色を停止し、標識細胞を、培地で 3 回洗浄する。細胞の計数を実施して、この染色プロセスを生存した生細胞数を測定する。細胞計数は、Neubauer チャンバー中でトリパンブルー染色を使用して実施する。均質な細胞標識を、UV 蛍光顕微鏡によって確認する。リンパ腫細胞および PBMC を、96 ウェル平底マイクロタイプレート (Nunc, Denmark) 中に播種する。次いで、選択した抗体を、新鮮なヒト血清（補体供給源として）およびサイトカインとともに添加する。その後、そのプレートを、加湿霧囲気中にて、37 および 5% CO₂ にて 3 日間インキュベートする。インキュベーションの後、そのプレートを、PBS 中で洗浄する。この洗浄工程の後、温 EDTA を（最終濃度 0.02% まで）補充しトリプシンを（最終濃度 0.05% まで）補充した、PBS を 50 μl、各ウェルに添加する。10 分間のインキュベーションの後、そのプレートを、プレート振盪器において 1 分間攪拌する。45% の FCS を含む PBS の 200 μl アリコートを、添加し（トリプシン活性をロックし）、ヨウ化プロピジウム (12.5 μg / ml) を、死細胞

10

30

40

50

の標識のために添加し、そして FITC 標識慢性リンパ球白血病リンパ球（150,000 細胞 / ml（すなわち、200 μlあたり30,000細胞））を、細胞数測定のための標準物として添加する。すべてのサンプル分析を、同一のゲートおよび機器設定を使用する FACS Scan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) フローサイトメーターにおけるフローサイトメトリーによって、実施する。各ウェル中の生腫瘍細胞数を、以下の式：

生腫瘍細胞 = 30,000 × (事象(腫瘍細胞ゲート)) / 事象(標準細胞ゲート))
を使用して計算する。ここで、30,000とは、各ウェルに添加する標準細胞の数である。

【0240】

10

(実施例19 可溶性タンパク質サンプル調製)

そのネイティブな可溶性対応物との比較のために、実施例1～9において生成するSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPのタンパク質成分を、37の0.1% Tween 80および25 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中に最終濃度約10 mg / ml～約20 mg / mlまでSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPを溶解(再懸濁)することによって、調製する。

【0241】

20

(実施例20 SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶SPPの安定性)

実施例2および3に従って調製したRituximab SPPまたはTrastuzumab SPPの安定性を、そのネイティブの可溶性対応タンパク質の安定性と比較した。

【0242】

図5は、同じ期間4にて保存した、Rituximab SPPとネイティブの可溶性Rituximabとの安定性の比較を示す。このRituximab SPPは、実施例19における方法に従って溶解させた。この分析は、SEC-HPLCによって実施した。その結果は、Rituximab SPPが、保存中には分解しなかったことを示す。

【0243】

30

図7は、実施例3および実施例2に従ってそれぞれ生成したTrastumab SPPおよびRituximab SPPを、ネイティブの可溶性Trastuzumabおよびネイティブの可溶性Rituximabと同じ条件下で同じ時間4で保存した場合の、SDS-PAGEゲルの図である。保存した後、ネイティブの可溶性Trastuzumabおよびネイティブの可溶性Rituximab、ならびに溶存Trastuzumab SPPおよび溶存Rituximab SPP(実施例19に従って溶解した)を、SDS-PAGEを使用して電気泳動した。図7は、Trastuzumab SPPおよびRituximab SPPが、そのネイティブの可溶性対応物と同じ条件下で保存した場合に安定であることを、示す。

【0244】

本発明に従うどのSPP、球状ナノクリスタル複合粒子、もしくは結晶SPP、またはそれらの組成物もしくは処方物の安定性も、この実施例の方法を使用して、それらのネイティブの可溶性対応物に対して試験し得る。

40

【0245】

(実施例21)

(賦形剤としてポリエチレンオキシド(PEO)を使用する、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの処方)

乾燥および貯蔵の間、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの安定性を増強するために、SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを賦形剤と共に処方し得る。SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを以下のように0.1%のポリエチレンオキシド水溶液を使用して処方し得る。このSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを、スwingingバケット回転子を備えつけたBe

50

c k m a n G S - 6 R ベンチトップ遠心機で 1 0 0 0 r p m で遠心分離することによって、調製緩衝液から分離し得る。次に、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P を、0 . 1 % のポリエチレンオキシド中に 3 時間懸濁し (Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO) 、次いで、遠心分離によって分離する。

【 0 2 4 6 】

(実施例 2 2)

(賦形剤としてスクロースを使用する、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P の処方)

この実施例において、スクロース (Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO) を、賦形剤として、調製緩衝液中の S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P に添加する。十分なスクロースを S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P に添加し、1 0 % (w / v) の最終スクロース濃度に達する。次いで、得られた懸濁液を室温で 3 時間タンブリングする。スクロースでの処理後、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P を、実施例 2 1 に記載するように、遠心分離によって液体から分離する。

【 0 2 4 7 】

(実施例 2 3)

(賦形剤としてトレハロースを使用する、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P の処方)

スクロースの代わりにトレハロース (Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO) を加えて、調製緩衝液中の最終濃度を 1 0 % (w / v) にすることにより、実施例 2 2 のとおりに S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P を処方しする。次いで、得られた懸濁液を室温で 3 時間タンブリングし、実施例 2 1 に記載したように、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P を遠心分離によって液体から分離する。

【 0 2 4 8 】

(実施例 2 4)

(賦形剤としてメトキシポリエチレングリコール (MOP EG) を使用する、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P の処方)

スクロースの代わりにメトキシポリエチレングリコール (Sigma Chemical Co. , St. Louis, MO) を加えて、調製緩衝液中の最終濃度を 1 0 % (w / v) にし、そして実施例 2 1 に記載されるように 3 時間の遠心分離後に分離することによって、実施例 2 2 のとおりに S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性 S P P を処方する。

【 0 2 4 9 】

(実施例 2 5)

(非経口注入に特に適切な安定な R i t u x i m a b S P P および T r a s t u z u m a b S P P の作製)

実施例 2 および 3 それぞれの方法に従う R i t u x i m a b S P P および T r a s t u z u m a b S P P の作製に使用する高い硫酸アンモニウム含量 (2 . 1 M) の濾過液は、S P P がヒトまたは別の動物に非経口注入を介して送達することを意図される場合には不利である。以下の方法を使用して動物 (とりわけ、ヒトを含む) への非経口送達を意図する S P P 溶液の硫酸アンモニウム含量を減少させた。

【 0 2 5 0 】

R i t u x i m a b S P P および T r a s t u z u m a b S P P を、実施例 2 および 3 それぞれに従って作製した。濾過液を、室温での 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心分離によって R i t u x i m a b S P P 溶液および T r a s t u z u m a b S P P 溶液から除去した。R i t u x i m a b S P P を、1 6 % の P E G 1 5 0 0 、9 % のエタノール、4 . 5 % のグリコフロール (g l y c o f u r o l) 、4 . 5 % の P l u r o n i c F 1 2 7 、および 0 . 0 9 M のトレハロースからなる溶液中に再懸濁した。T r a s t

10

20

30

40

50

uzumab SPPを、16%のPEG1500、9%のエタノール、4.5%のグリコフロール(glycofuro1)、4.5%のPluronics F127、0.09Mのトレハロースおよび4.5%のプロピレングリコールからなる溶液中に再懸濁した。遠心分離工程を2度繰り返し、Rituximab SPPおよびTrastuzumab SPPを最終濃度(溶液中のタンパク質)が10mg/mlである同一の各溶液に再懸濁した。

【0251】

(結果:)

この実施例に従って作製されるRituximab SPP溶液およびTrastuzumab SPP溶液、ならびにこれらの可溶性対応物を26で2週間貯蔵した。1週目および2週目に、Rituximab SPPおよびTrastuzumab SPPの安定性が、それらの天然の安定性、可溶性対応物の安定性と同等であることが見出された。図16を参照のこと。

【0252】

(実施例26)

(SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPP、またはそれらの組成物もしくは処方物を乾燥する方法)

方法1. 室温でのN₂気体乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPおよびそれらの組成物もしくは処方物を、50mlのFisherブランドの使い捨て遠心分離チューブ(ポリプロピレン)中にスwingバケット回転子を備えるBeckman GS-6Rベンチトップ遠心機で、1000rpmでの遠心分離によって賦形剤を含有する調製緩衝液から分離する。次いで、このSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを、約10psiの圧力で窒素流をチューブに一晩流すことによって乾燥させる。

【0253】

方法2. 真空炉乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPおよびそれらの組成物もしくは処方物を、50mlのFisherブランドの使い捨てポリプロピレン遠心分離チューブ中にスwingバケット回転子を備えるBeckman GS-6Rベンチトップ遠心機中で、1000rpmでの遠心分離を使用して、調製緩衝液/賦形剤溶液からまず分離する。次いで、湿潤のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを、室温で25mmの水銀圧(VWR Scientific Products)で真空炉中に配置し、少なくとも12時間乾燥させる。

【0254】

方法3. 凍結乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPまたはそれらの組成物および処方物を、50mlのFisherブランドの使い捨てポリプロピレン遠心分離チューブ中にスwingバケット回転子を備えるBeckman GS-6Rベンチトップ遠心機中で、1000rpmでの遠心分離を使用して、調製緩衝液/賦形剤溶液からまず分離する。次いで、湿潤SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを、不十分に閉じたバイアル中でVirrtis Lyophilizer Model 124を使用して、凍結乾燥させる。凍結工程の間に、棚温度を-40まで徐々に下げる。この温度を16時間維持する。次いで、2次乾燥をさらに8時間実施し得る。

【0255】

方法4. 有機溶媒乾燥および空気乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPまたはそれらの組成物および処方物を、50mlのFisherブランドの使い捨てポリプロピレン遠心分離チューブ中にスwingバケット回転子を備えるBeckman GS-6Rベンチトップ遠心機中で、1000rpmでの遠心分離を使用して、濾過液/賦形剤溶液からまず分離する。次いで、このSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPをエタノールまたはイソプロパノールまたは酢酸エチルまたは他の適切な溶媒のような有機溶媒中に懸濁し、遠心分離する。次いで、この上清をデカントし、SPPを換気フード中、室温で、約30分間~約2日間(SPPサンプルのサイズに依

10

20

30

40

50

存する)、SPPが完全に乾燥するまで、空気乾燥させるかまたは穏やかな窒素流下で乾燥させる。

【0256】

方法5. 室温での空気乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPまたはそれらの組成物および処方物を、50mlのFisherブランドの使い捨て遠心分離チューブ(ポリプロピレン)中にスウェイリングバケット回転子を備えるBeckman GS-6Rベンチトップ遠心機中で、1000rpmでの遠心分離によって、賦形剤を含む調製緩衝液から分離する。続いて、このSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを換気フード中で2日間空気乾燥させる。

【0257】

方法6. 噴霧乾燥: SPP、球状ナノクリスタル複合粒子もしくは結晶性SPPまたはそれらの組成物および処方物を、Buchi Mini Spray Dryer Model B-191を使用して噴霧乾燥する。30~50mg/mlの濃度のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを噴霧乾燥に使用する。

【0258】

(実施例27)

(Rituximab SPPの乾燥):

Rituximab結晶を、実施例6の方法に従って作製し、そして実施例26の方法4に従って乾燥する。

【0259】

Rituximab SPPの乾燥:

濾過液中にRituximab SPPを1.5mg含有する溶液を、室温で10分間1000rpmで遠心分離した。次いで、この濾過液をRituximab SPPから除去し、そしてRituximab SPPを、70%の2-プロパノール(イソプロパノール)中の6%のPluronnic F127(界面活性剤)(BASF corporationからの贈り物)に再懸濁した。次いで、この溶液を、溶媒が除去され得るまで(室温で10分間)1000rpmで遠心分離した。溶媒を除去し、そしてRituximab SPPを25%のプロピレングリコール/75%の2-プロパノールの溶液中に再懸濁した。次いで、この溶媒を1000rpmでの遠心分離(室温で10分間)によってこの溶液から除去し、そしてRituximab SPPを100%の2-プロパノール中に再懸濁した。次いで、2-プロパノールを1000rpmでの遠心分離(室温で10分間)によってこの溶液から除去した。次いで、Rituximab SPPを穏やかな窒素流中で乾燥させた。このサンプルサイズは小さい(1.5mg)ので、SPPは、45分後に完全に乾燥した。

【0260】

(実施例28)

(ジメチル3,3'-ジチオビスイソプロピオンイミダート・HCl(DTBP)架橋)ジメチル3,3'-ジチオビスイソプロピオンイミダート HCl(DTBP)溶液を、27.9mgのDTBPを60mlの水中に溶解することによって調製する。次いで、この溶液の40mlのアリコートをSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPに加える(10mMの塩化カルシウムと20%のMPDを含有する、10mMのHEPES緩衝液(pH8.5)1.5ml中に21mg)。タンブリングをしながら24時間、周囲温度で架橋を実施する。次いで、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mMの塩化カルシウムおよび20%のMPDを含有する10mMのHEPES緩衝液(pH7.5)に懸濁する。追加量のDTBP(20ml)を加え、架橋をさらに24時間続ける。架橋を、1回あたり1mlの10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8、10mM塩化カルシウムおよび20%MPDを含有)で5回、過剰な試薬を洗浄することによって終結する。

【0261】

(実施例29)

10

20

30

40

50

(ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(D S P)架橋)

ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)(D S P)溶液を、60m1のジメチルスルホキシド(D M S O)中に36mgのD S Pを溶解させることによって調製する。この溶液の40m1のアリコートをS P P、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性S P Pに加える(10mMの塩化カルシウムと20%のM P Dを含有する、10mMのH E P E S緩衝液(p H 8 . 5)1 . 5m1中に21mg)。タンブリングをしながら24時間、周囲温度で架橋を実施する。次いで、このスラリーを3000r p mで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mMの塩化カルシウムおよび20%のM P Dを単有する10mMのH E P E S緩衝液(p H 7 . 5)に懸濁する。追加量のD T B P(20m1)を加え、架橋をさらに24時間続ける。架橋を、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(p H 4 . 8、10mM塩化カルシウムおよび20%M P Dを含有)で(各回1m1の緩衝液で5回)、過剰な試薬を洗浄することによって終結する。

【0262】

(実施例30)

(ビスマレイミドヘキサン(B M H)架橋)

ビスマレイミドヘキサン(B M H)溶液を、40m1のジメチルスルホキシド(D M S O)中に12mgのB M Hを溶解させることによって調製する。この溶液の40m1のアリコートをS P P、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性S P Pに加える(10mMの塩化カルシウムと20%のM P Dを含有する、10mMのH E P E S緩衝液(p H 7 . 5)1 . 5m1中に21mg)。タンブリングをしながら24時間、周囲温度で架橋を実施する。次いで、このスラリーを3000r p mで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mMの塩化カルシウムおよび20%のM P Dを含有する10mMのH E P E S緩衝液(p H 7 . 5)に懸濁する。追加量のB M H(20m1)を加え、架橋をさらに24時間続ける。架橋を、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(p H 4 . 8、10mM塩化カルシウムおよび20%M P Dを含有)で、過剰な試薬を洗浄する(1m1の緩衝液で5回)ことによって終結する。

【0263】

(実施例31)

(ビス[スルホスクシンイミジル]スペレート(B S)架橋)

ビス[スルホスクシンイミジル]スペレート(B S)溶液を、50m1の水中に29mgのB Sを溶解させることによって調製する。この溶液の40m1のアリコートをS P P、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性S P Pに加える(10mMの塩化カルシウムと20%のM P Dを含有する、10mMのH E P E S緩衝液(p H 8 . 5)1 . 5m1中に21mg)。タンブリングをしながら24時間、周囲温度で架橋を実施する。次いで、このスラリーを3000r p mで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mMの塩化カルシウムおよび20%のM P Dを含有する10mMのH E P E S緩衝液(p H 7 . 5)に懸濁する。追加量のB S(20m1)を加え、架橋をさらに24時間続ける。架橋を、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(p H 4 . 8、10mM塩化カルシウムおよび20%M P Dを含有)で、過剰な試薬を洗浄する(1m1の緩衝液で5回)ことによって終結する。

【0264】

(実施例32)

(1, 5 -ジフルオロ-2, 4 -ジニトロベンゼン(D F D N B)架橋)

1, 5 -ジフルオロ-2, 4 -ジニトロベンゼン(D F D N B)溶液を、40m1のアセトン中に10mgのD F D N Bを溶解させることによって調製する。この溶液の40mのアリコートをS P P、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性S P Pに加える(10mMの塩化カルシウムと20%のM P Dを含有する、10mMのH E P E S緩衝液(p H 8 . 5)1 . 5m1中に21mg)。タンブリングをしながら24時間、周囲温度で架橋を実施する。次いで、このスラリーを3000r p mで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mMの塩化カルシウムおよび20%のM P Dを含有する10m

10

20

30

40

50

MのHEPES緩衝液(pH7.5)に懸濁する。追加量のDFDNB(20ml)を加え、架橋をさらに24時間続ける。架橋を、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8、10mM塩化カルシウムおよび20%MPDを含有)で、過剰な試薬を洗浄する(1mlの緩衝液で5回)ことによって終結する。

【0265】

(実施例33 ジメチルスペルイミデート2HCl(DMS)の架橋：)

ジメチルスペルイミデート2HCl(DMS)溶液を、40mlのジメチルスルホキシド(DMSO)中に33mgのDMSを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、24時間回転させながら実行する。次いで、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM HEPES緩衝液(pH7.5)中に懸濁する。さらなる量のDMS(20ml)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋反応を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

【0266】

(実施例34 ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)の架橋：)

ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)溶液を、50mlのジメチルスルホキシド(DMSO)中に17mgのDSGを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。その後、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM HEPES緩衝液(pH7.5)中に懸濁する。さらなる量のDSG(20ml)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

【0267】

(実施例35 ジスルホスクシンイミジルタートレート(Sulfo-DST)の架橋：)

ジスルホスクシンイミジルタートレート(Sulfo-DST)溶液を、50mlの水中に27mgのSulfo-DSTを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。その後、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM HEPES緩衝液(pH7.5)中に懸濁する。さらなる量のSulfo-DST(20ml)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

【0268】

(実施例36 1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロライド(EDC)の架橋：)

1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロライド(EDC)溶液を、1mlの水中に10mgのEDCを溶解させることによって調製する。この溶液の200mlアリコートおよび5mgの固体Sulfo-NHSを、SPP、球状

ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。24時間後、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む50mM MES緩衝液(pH6)中に懸濁する。さらなる量のEDCおよびSulfo-NHS(200mlおよび5mg Sulfo-NHS)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

10

【0269】

(実施例37 エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネット](Sulfo-EGS)の架橋：)

エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネット](Sulfo-EGS)溶液を、40mlの水中に33mgのSulfo-EGSを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。次いで、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM HEPES緩衝液(pH7.5)中に懸濁する。さらなる量のSulfo-EGS(20ml)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

20

【0270】

(実施例38 N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル(GMBS)の架橋：)

N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル(GMBS)溶液を、50mlのジメチルスルホキシド(DMSO)中に23mgのGMBSを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。次いで、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM HEPES緩衝液(pH7.5)中に懸濁する。さらなる量のGMBS(20ml)を添加し、架橋をさらに24時間継続する。この架橋反応を、10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと(1mlの緩衝液で5回)によって終結する。

30

【0271】

(実施例39 N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(Sulfo-HSAB)の架橋：)

N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(Sulfo-HSAB)溶液を、40mlの水中に5mgのSulfo-HSABを溶解させることによって調製する。この溶液の40mlアリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPP(10mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1.5mlの10mM HEPES緩衝液(pH8.5)中に21mg)に添加する。架橋を、周囲温度で24時間回転させながら実行する。次いで、このスラリーを3000rpmで遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを10mM 塩化カルシウムおよ

40

50

び 20% MPD を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.5) 中に懸濁し、そして第 2 の架橋を、254 nm の UV 光を使用して (UV ランプをサンプルから 2.5 cm 離しておくことによって)、周囲温度で 10 分間振盪しながら実行する。10 分後、このスラリーを 3000 rpm で遠心分離し、そして上清を廃棄する。この架橋を、10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと (1 ml の緩衝液で 5 回) によって終結する。

【0272】

(実施例 40 スルホスクシンイミジル - 6 - [a - メチル - a - (2 - ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート (Sulfo-LC-SMPT) の架橋：)

スルホスクシンイミジル - 6 - [a - メチル - a - (2 - ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート (Sulfo-LC-SMPT) 溶液を、60 ml の水中に 12 mg の Sulfo-LC-SMPT を溶解させることによって調製する。この溶液の 40 ml アリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶 SPP (10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 1.5 ml の 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.5) 中に 21 mg) に添加する。架橋を、周囲温度で 24 時間回転させながら実行する。次いで、このスラリーを 3000 rpm で遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、ペレットを 10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.5) 中に懸濁する。さらなる量の Sulfo-LC-SMPT (20 ml) を添加し、架橋をさらに 24 時間継続する。この架橋を、10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと (1 ml の緩衝液で 5 回) によって終結する。

【0273】

(実施例 41 ビス - [b - (4 - アジドサリチルアミド) エチル] ジスルフィド (BASED) の架橋：)

ビス - [b - (4 - アジドサリチルアミド) エチル] ジスルフィド (BASED) 溶液を、40 ml のジメチルスルホキシド (DMSO) 中に 3 mg の BASED を溶解することによって調製する。この溶液の 40 ml アリコートを、SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶 SPP (10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 1.5 ml の 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 8.5) 中に 21 mg) に添加する。架橋を、365 nm の UV 光を使用して (UV ランプをサンプルから 2.5 cm 離しておくことによって)、周囲温度で 30 分間振盪しながら実行する。30 分後、このスラリーを 3000 rpm で遠心分離し、そして上清を廃棄する。この架橋を、10 mM 塩化カルシウムおよび 20% MPD を含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) を用いて過剰な試薬を洗い落とすこと (1 ml の緩衝液で 5 回) によって終結する。

【0274】

(実施例 42 グルタルアルデヒドの架橋：)

Rituximab SPP (実施例 2 の方法に従って調製された) を、最終架橋剤濃度 0.1% に未処理のニートグルタルアルデヒド (Sigma) を添加することによって架橋した。架橋を 1 時間進行させたままにした。この SPP または結晶 SPP を低速遠心分離によって取り出し、そして 10 mM Tris 緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。

【0275】

(実施例 43 可逆性架橋剤 - ジスルフィド架橋化 SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶 SPP)

SPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶 SPP を、以下の架橋剤のうちの 1 つを使用して架橋し得る：

1) ジメチル 3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート HCl - (DTBP) (Pierce)

2) ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート) - (DSP) (Pierce)。

【0276】

架橋を、1.5 ml 微量遠心チューブ (USA / Scientific) 内で、500 m

10

20

30

40

50

1 の緩衝液 (10 mM 酢酸カルシウムおよび20% MPDを含む10 mM HEPES緩衝液 (pH 8.5)) 中に250 mlのSPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPPの溶液 (21 mg)を入れることによって実行する。1つの架橋剤を、各チューブに以下のように添加した：A) DTPB (60 mM) (27.9 mgのDTPBを60 mlの水中に溶解し、そして20 mlのこの溶液を添加する)；およびB) DSP (14.84 mM) (36 mgのDSPを120 mlのDMSO中に溶解し、そして10 mlのこの溶液を添加する)。

【0277】

このチューブを、周囲温度 (24 ~ 26) で、全てのサンプルが32 mM NaOH 中で不溶性であること (2日間) (150 mlのNaOH中で50 mlのサンプルを使用する) が決定されるまで回転させる。架橋されてないサンプルは、同濃度で32 mM NaOH中に容易に溶解する。架橋を、3000 rpmで5分間遠心分離すること、ならびに上清を廃棄し、そして10 mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む1 mlの10 mM Tris·HCl緩衝液 (pH 7.0) の添加によって停止させ、そして洗浄手順を3回繰り返す。

【0278】

(実施例44 ジスルフィド結合を含む、架橋されたSPPまたはSPP結晶の溶解)
200 mM システイン溶液を、10 mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10 mlの10 mM Tris·HCl緩衝液 (pH 7) 中に242 mgのシステインを溶解することによって調製する。架橋されたSPP、球状ナノクリスタルコンポジット粒子、または結晶SPPの200 mlのサンプルを取り、そして3000 rpmで5分間遠心分離し、そして上清を廃棄する。このペレットを、Tris緩衝液を含む200 mM システイン中に溶解する。別の200 mlの架橋されたサンプルを取り、そして3000 rpmで5分間遠心分離し、そして上清を廃棄する。次いで、このペレットをシステインを含まない200 mlのTris緩衝液中に懸濁する。全てのサンプルを37で1時間インキュベートし、そして32 mM NaOH中の溶解についてモニタリングする(直接の視覚的観察および顕微鏡観察)。

【0279】

37で1時間インキュベーション後、このDTPBサンプルは、システイン存在下では完全に可溶性であり、そしてシステイン非存在下では不溶性である。このDSPサンプルは、システイン存在下でほとんど溶解性がなく、そしてシステイン非存在下では不溶性である。

【0280】

(実施例45)
(架橋化SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの37でのpH溶解度の特徴づけ)

ジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミダート·HCl (DTPB)、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート) (DSP)、ビスマレイミドヘキサン (BMH)、ビス[スルホスクシンイミジル]スペレート (BS)、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (FDNB)、ジメチルスペルイミダート·2HCl (DMS)、ジスクシンイミジルグルタレート (DSG)、ジスルホスクシンイミジルタタレート (スルホ-DST)、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド (EDC)、エチレングリコビス[スルホスクシンイミジルスクシネット] (スルホ-EGS)、N-[g-マレイミドブチリルオキシ]スクシンイミドエステル (GMBS)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (スルホ-HSAB)、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート (スルホ-LC-SMPT)、ビス-[4-b-(アジドシリルアミド)エチル]ジスルフィド (BASED) またはグルタルアルデヒド (GA) で架橋された種々のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの溶解度を、この方法を使用して研究し得る。

【0281】

1.5 ml エッペンドルフチューブ中で、非架橋のSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPおよび架橋されたSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPP調製物(2.8 mgタンパク質に相当)を、3000 rpmで5分間微量遠心し、そしてその上清の液体を除去する。2つのpHを試験する：a)pH 7.4およびb)pH 2.0。

【0282】

pH 7.4について、200 ml アリコートのPBS緩衝液(0.01 M リン酸、0.0027 M 塩化カリウム、0.137 M 塩化ナトリウム、pH 7.4)を、各サンプルに添加し、タンパク質の濃度を14 mg/mlにする。これらのサンプルを、37で24時間インキュベートする。

【0283】

pH 2.0について、200 ml アリコートのグリシンHC1緩衝液(pH 2.0)を、各サンプルに添加し、タンパク質の濃度を14 mg/mlにする。これらのサンプルを、37で5時間インキュベートする。最初に、これらのサンプルを、10 mM 塩化カルシウムおよび20% MPDを含む10 mM グリシンHC1緩衝液(pH 2.0)で、タンブルリングしながら25で一晩処理し、次いでグリシンHC1緩衝液のみで続行する。

【0284】

24時間/5時間後、サンプルを14,000 rpmで5分間遠心分離することによる解離について、サンプルを研究し、そしてこの上清を、0.22 mmフィルターに通す。2 mlのアリコートを取り、それを798 mlの脱イオン水中に入れることによって、このタンパク質を推算する。200 ml アリコートのBio-Radプロテインアッセイ試薬を、このサンプルに添加し、次いで、このサンプルを周囲温度で5分間インキュベートし、そして595 nm 波長で測定する(Bradfordの方法によるBio-Radマイクロプロテインアッセイ)。標準として、Pierceからのウシ血清アルブミンを、約0~20 mgタンパク質の範囲内で使用する。

【0285】

(実施例46)

(FTIRによる三次構造の特徴づけ)

以下の方法は、アッセイされるタンパク質の三次構造を測定するために有用である。この方法において、溶解しているSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPに由来のタンパク質の三次構造を、それらのネイティブの可溶性対応物と比較し得る。この方法において、ネイティブの生物学的活性タンパク質に対する、例えば、1) SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPを形成すること、2) 短期保存または長期保存、および3) SPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPの組成物または処方物を作製すること、の効果を決定し得る。

【0286】

Dongらに記載されるように、フーリエ変換赤外線(FTIR)スペクトルを、Nicolet model 550 Magnaシリーズ分光光度計で収集する[Dong, A., Caughey, B., Caughey, W. S., Bhat, K. S. およびCoe, J. E. Biochemistry, 1992; 31: 9364-9370; Dong, A. Prestrelski, S. J., Allison, S. D. およびCarpenter, J. F. J. Pharm. Sci., 1995; 84: 415-424]。

【0287】

固体サンプルについて、1~2 mgのタンパク質を、350 mgのKBr粉末と共に軽く粉碎し、拡散反射率付属物のために使用される小さいカップに詰める。

【0288】

あるいは、溶液分析について、拡散反射法のかわりに、減衰全反射法(ATR)を使用する。

【0289】

このスペクトルを収集し、次いでGrams 3.2 (Galactic Softwareから)を使用して処理し、二次構造の個々の成分の相対領域の決定には、アミドI領域($1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$)のもとで、二階微分および曲線当てはめ(curve-fitting)プログラムを使用する。

【0290】

Nicoletからのタンパク質分析ソフトウェアを使用して、相関係数が算出される。このソフトウェアは、予め保存された参照スペクトルと現在のタンパク質スペクトルとの間の相関係数の決定を容易に可能にする(Garland, B, FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States. Nicolet application note # AN 9479)。ネイティブの水溶性タンパク質の二階微分スペクトルを参照スペクトルとして使用し、そして乾燥したSPP、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶性SPPおよび凍結乾燥した固体タンパク質を、サンプルとして使用し得る。相関係数が1に近づくにつれて、タンパク質はますます類似した三次立体配座構造を有する。変性は、0.8より小さい相関係数によって示される。これは、1)ネイティブタンパク質の-シート含量が、増加しているか、または減少しているかのいずれかであるか、あるいは2)ネイティブタンパク質の-ヘリックス含量が減少しているのみであることを示す(すなわち、タンパク質の-シート含量は、変性の際に増加または減少し得るが、一方、タンパク質の-ヘリックス含量は、変性の際には常に減少する)。従って、0.8より小さい相関係数は、このタンパク質のネイティブの生物学的活性形態に対して、アッセイされるタンパク質が変性していることに起因する三次構造の変化を示す。

【0291】

(実施例47)

(円二色性分光法による二次構造の特徴づけ)

円二色性(CD)は、分子の光学特徴であり、これは、分子構造の不斉特性を反映する。CD分光法は、CDを測定するための方法であり、そして分子の構造的特性の迅速な決定に有用である。CDスペクトルは、タンパク質の二次構造(アッセイされるタンパク質の-シート含量、-ヘリックス含量、-ターン含量およびランダムコイル含量を含む)の特徴づけを可能にする。CDスペクトルは、核酸の構造の型の特徴づけ(とりわけ、核酸分子がA型(A-DNAまたはA-RNA)、B型(B-DNA)あるいはZ型(Z-DNA)のいずれであるか、を含む)をさらに可能にする。この方法において、溶解しているSPP、球状ナノクリスタル複合粒子、結晶性SPPあるいは球状核酸粒子もしくは球状ナノクリスタル複合核酸粒子または結晶性球状核酸粒子に由来するタンパク質または核酸の二次構造を、それらの可溶性の対応物と比較し得る。この方法において、ネイティブの生物学的活性タンパク質に対する、例えば、1)SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性SPPあるいは球状核酸粒子もしくは球状ナノクリスタル複合核酸粒子または結晶性球状核酸粒子を形成すること、2)短期保存または長期保存、および3)SPP、球状ナノクリスタル複合粒子、または結晶性SPPあるいは球状核酸粒子または球状ナノクリスタル複合核酸粒子、結晶性球状核酸粒子の組成物または処方物を作製すること、の効果を決定し得る。

【0292】

円二色性(CD)は、光学活性な物質が、左側円偏光または右側円偏光のどちらを優先的に吸収するかを示す。CDは、タンパク質およびペプチドの二次構造の特徴(-ヘリックス、-シート、ターンおよびコイルを含む)を規定し得る。CD分光法は、以下のものをモニタリングするために使用されている：1)二次構造、2)立体配置変化、3)環境の影響、4)タンパク質の折りたたみおよび変性、ならびに5)動力学。

【0293】

(方法：)

Infliximab SPP、Rituximab SPPおよびTrastuzum

10

20

30

40

50

a b S P P を、各々、実施例 1 ~ 3 の方法に従って作製した。Infliximab S P P 、Rituximab S P P およびTrastuzumab S P P を、実施例 19 の方法に従って溶解した。溶解した S P P から得た抗体の二次構造を、Jasco - 810 旋光分散計を用いて決定し、そして対応する市販の可溶性タンパク質と比較した。このタンパク質 S P P サンプルを、脱イオン水で溶解および希釈し、終濃度を 0.17 ~ 0.33 mg / ml とした。標準的な 0.1 cm パス長キュベット (200 μl サンプルサイズ) を用いて、260 ~ 195 nm (ナノメートルでの波長) のスペクトルを得た。3 セット全てのサンプル (Trastuzumab S P P 、Rituximab S P P およびInfliximab S P P の溶解 S P P と可溶性タンパク質の両方) について、スペクトルは、溶解 S P P のスペクトルと可溶性タンパク質サンプルのスペクトルとの間の有意な差異を示さなかった。
10

【0294】

結果：図 11、図 12 および図 13 を参照のこと。

【0295】

(実施例 48)

(ELISA によるコンフォーメーション特徴付け)

ELISA は、モノクローナル抗体がタンパク質の特定のエピトープを認識しそして結合する能力を測定する。モノクローナル抗体は、主に、エピトープの全体的なコンフォーメーションおよびエピトープを構成するアミノ酸の部分的なコンフォーメーションに結合する。ネイティブタンパク質が変性した場合、またはそのコンフォーメーションがある程度変化した場合、モノクローナル抗体は、もはやエピトープを認識できず、結合できない。従って、ネイティブの、可溶性の、S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P のタンパク質成分の対照物に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いることによって、ELISA は、溶解 S P P 、球状ナノクリスタル複合粒子または結晶 S P P 由来のタンパク質の抗原構造と、そのネイティブの可溶性対照物抗原構造とを比較するのに役立つ。
20

【0296】

(方法)

(Trastuzumab ELISA のためのプロトコル)

Corning Costar 96 - ウエルプレート (Corning, Life Sciences Division, Acton, MA) を、50 μl のヤギ抗ヒト Ig G (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) (50 mM カーボネート緩衝液 (pH 9.6) 中の 10 μg / ml の濃度) でコーティングした。このプレートを、4 で一晩コーティングした。
30

【0297】

次の日、この抗ヒト抗体を、プレートから吸引して除き、その後、プレートを、0.05 % Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) (TBS-T) でトリス緩衝化生理食塩水で 3 回洗浄した。

【0298】

次いで、これらのプレートを、プレートの各ウェルに 200 μl のブロッキング緩衝液 (TBS-T 中の再構築された 3 % 脱脂乾燥乳) を添加してブロックした。これらのプレートを、室温 (21 ~ 25) で 2 時間、暗所にてインキュベートした。
40

【0299】

プレートをブロッキングしている間、Trastuzumab サンプル (溶解 Trastuzumab S P P (実施例 3 の方法に従って作成し、実施例 19 の方法に従って溶解した) か、またはネイティブの可溶性 Trastuzumab のいずれかから得られる Trastuzumab S P P) を最終濃度 (10 ng / ml) まで希釈緩衝液 (ブロッキング緩衝液 + 1 % 正常マウス血清) 中に希釈し、毎回 1 : 1 の希釈を続けて 6 回行った。Trastuzumab サンプルの最終濃度は、10 ng / ml 、 5 ng / ml 、 2.5 ng / ml 、 1.25 ng / ml 、 0.625 ng / ml 、 0.3125 ng / ml および 0.15625 ng / ml であった。
50

【0300】

これらのプレートを2時間ブロックした後、 $200\mu l$ / ウェルのTBS Tで3回洗浄した。次いで、適切に希釈したサンプル($100\mu l$)を、プレートの適切なウェルに添加した。ブロッキング緩衝液のみを含む(Trastuzumabなし)ウェルを、コントロールとして用いた。次いで、このプレートを、室温($21\sim25$)で1時間、暗所にてインキュベートした。

【0301】

インキュベーション期間の後、このプレートを $200\mu l$ / ウェルのTBS Tで3回洗浄した。次いで、 $100\mu l$ の西洋ワサビペルオキシダーゼ結合Fc特異的抗ヒトIgG(Sigma, St. Louis, MO)を、プレートの各ウェルに添加した。次いでこれらのプレートを、室温($21\sim25$)で1時間、暗室にてインキュベートした。
10

【0302】

インキュベーション期間の後、これらのプレートを $200\mu l$ / ウェルのTBS Tで3回洗浄した。次いで、 $100\mu l$ の基質3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン(TMB)(過酸化水素(H_2O_2)の存在下)を各ウェルに添加した。次いでこれらのプレートを、室温($21\sim25$)で30分間、暗室にてインキュベートし、発色させた。次いでこの呈色反応を、 $100\mu l$ の1N(規定)硫酸(H_2SO_4)を各ウェルに添加して停止した。各ウェル中の溶液の最適濃度(OD)を、Softmax Pro software Molecular Devices(Sunnyvale, CA)を備えた分子デバイス「SpectraMAX plus」自動プレートリーダーを用いて、450nm(OD₄₅₀)の波長で測定した。各ウェルについて測定したOD₄₅₀は、ウェルをコーティングしている抗ヒト抗体に結合するTrastuzumabの量に正比例した。
20

【0303】**(結果)**

溶解Trastuzumab SPPから得たTrastuzumabは、そのネイティブの可溶性対照物と同じコンフォメーションを有し、Trastuzumab SPPを形成するプロセスは、ネイティブTrastuzumab抗体のコンフォメーションを変化させないことを立証したこと。図14を参照のこと。

【0304】**(実施例49)****(Trastuzumab動物モデル)**

Trastuzumabは、乳癌の処置に用いられ得る[Pietras R. J., Poen J. C., Gallardo, D., Wongvipat P. N., Lee H. J. およびSlamon D. J., Cancer Res, vol. 59, 1347~55頁(1999); Baselga, J., Norton L., Albanel J., Kim Y. M., Mendelsohn J., Cancer Research, vol. 58, 2825~31頁(1998)]。

【0305】**(手順)**

Trastuzumab SPPを、実施例3の方法に従って作成した。
40

【0306】**(ヌード・マウスにおける腫瘍形成の手順)**

ヒト乳癌SK-BR3細胞またはヒト乳癌BT-474細胞(American Type Culture Collection(ATCC)(Manassas, Virginia, USA))を、10%ウシ胎仔血清(FBS)、2mMグルタミン、および1%ペニシリンG/ストレプトマイシン/菌食性溶液を加えたBRLM1640培地中で培養した。数細胞世代後、ヒト乳癌細胞を、3月齢メス胸腺欠損マウスの後肢大腿に皮下接種(s.c.)(5×10^7 細胞/動物)した。

【0307】

接種の前に、マウスを、10～14日間、生分解性キャリア結合体中の17-エストラジオール(ペレット当り1.7mgのエストラジオール)を皮下に与えてプライミングし、エストロゲン依存性乳癌細胞の成長を促進した。腫瘍瘤塊を、その大きさ(mm)で測定することにより、モニターした。各処置群には、5～6動物が含まれる。これらの動物を、各処置の開始時点での体重および腫瘍瘤塊サイズに関して、ランダムに選択した。1つのセットのサイズにおいて、腫瘍が20～30mm³より大きく成長したとき、または第2のセットのサイズが350mm³より大きく成長したときに、抗体処置を開始した。組換ヒト(rhu)Mab HER-2抗体(Trastuzumab)SPP(懸濁状態)または「非SPP」結晶(これもまた懸濁状態)を、動物の体重1kgあたり10mgの用量で、1日に3回の投薬形態で、4日間隔で(12日にわたって)皮下投与した。
コントロールの注射は、ヒトIgG1(30mg/kg)の注射であり、これもまた、同じ投与プロトコルを用いて皮下投与した。次いでマウスを、病理学実験のために屠殺した。

【0308】

(結果)

Trastuzumab SPPおよびTrastuzumab(非SPP)結晶の両方とも、生理食塩水(細胞送達ビヒクルとして用いられた)または非特異的IgGからなるコントロールと比較した場合、マウスへのBT474細胞の注射によって形成された腫瘍の大部分または全てを除去し、ヒト乳癌についてのマウス動物モデルにおいてTrastuzumab SPPが有効であることを明らかに示した。ヒト乳癌に対するTrastuzumab SPPの使用の有効性を、Trastuzumab結晶の使用の有効性と比較したときの結果を示した、図6を参照のこと。

【0309】

上記の動物実験は、本発明による他の抗体SPP、抗体球状ナノクリスタル複合粒子および結晶抗体SPP(とくに、InfliximabおよびRituximabが挙げられる)に対して適応する。

【0310】

(実施例50)

(ネイティブ(可溶性)および溶解したRituximabおよびTrastuzumabのオリゴ糖プロファイル)
オリゴ糖プロファイルを実施し、ネイティブの、可溶性Rituximabおよび可溶性Trastuzumabと、(溶解したRituximab SPPから得られたRituximab(実施例2の方法に従って作製した)および溶解したTrastuzumab SPPから得られたTrastuzumab(実施例3の方法に従って作製した)との炭水化物組成を比較した。Rituximab SPPおよびTrastuzumab SPPを、実施例19の方法に従って溶解した。

【0311】

(手順)

オリゴ糖プロファイルを、Beckman-Coulter P/ACE MDQ in instrumentのキャピラリー電気泳動により実施し、続いてBeckman-Coulter E-CAPキットを用いて、炭水化物の標識および分析を行った。

【0312】

Trastuzumab SPPおよびRituximab SPP(それぞれ、実施例2および実施例3由来)を、洗浄し、溶解し、そしてddH₂Oで透析し、(製造業者によって供給される)可溶性TrastuzumabサンプルおよびRituximabサンプルを、ddH₂Oで透析した。各サンプルの200μgのアリコートを、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)で再構成した。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、(2-メルカプトエタノール)(-ME)、およびNP-40(Tergitol)を添加し、N-結合オリゴ糖切断を改善した。引き続き、PNGase(アスパラギン結合オリゴ糖を切断する酵素)を、各サンプルに添加し、そしてそれらのサンプルを、37度一晩

10

20

30

40

50

インキュベートした。次いで、タンパク質を、3倍量の冷却エタノールで沈殿させ、サンプルをスピンし、そして上清（オリゴ糖を含む）を回収しそして凍結乾燥した。オリゴ糖サンプルを、再構成し、そしてNaBH₃CN（APTS処理後の再構成による標識試薬と炭水化物との間のイミン結合を減少させる還元剤である、シアノボロヒドリドナトリウム）存在下で、37度一晩、1-アミノビレン-3,6,8-トリスホネート（APTS）を用いて蛍光標識した。これらのサンプルを、一晩インキュベートし、水中に希釈し、そしてレーザー誘起蛍光（LIF）検出器を用いたP/A C E M D Q キャピラリー電気泳動装置で読み取った。キャピラリーは、e-CAP炭化水素分析キットを備えたBeckman-Coulterにより提供される、N-CHOコーティングキャピラリーを用いた。

10

【0313】

（結果）

これらの結果は、溶解抗体SPPから得た抗体は、それらのネイティブの、可溶性対照物と同じ炭化水素含有量を有することを示し、Rituximab SPPおよびTrastuzumab SPPの形成プロセスは、ネイティブのRituximab抗体およびTrastuzumab抗体の炭水化物含有量を変化させないことを実証した。図15を参照のこと。

【0314】

（実施例51）

（透過電子顕微鏡（TEM）を用いて観察したRituximab SPP）

20

透過電子顕微鏡法：

実施例2の方法に従って作製したRituximab SPPサンプルを、エポキシ樹脂に包埋し、固めた。このRituximab SPP試料をミクロトーム切断し、そして炭素電子顕微鏡グリッド上に置いた。高倍率TEM画像を、60kVでのPhilips CM10透過電子顕微鏡操作を用いて得た。

（結果）

電子顕微鏡は、Rituximab SPPの層状殻構造を示した。この電子顕微鏡写真はまた、Rituximab SPPの結晶領域における4nm格子空間を示した。

【0315】

（実施例52）

（走査電子顕微鏡（SEM）を用いて観察したRituximab SPPおよびTrastuzumab SPP）

30

走査電子顕微鏡法：

それぞれ実施例2および実施例3の方法に従って作製した、Rituximab SPPまたはTrastuzumab SPPのサンプルを、新たに準備した炭素コーティングした金支持グリッド上に置いた。過剰量の緩衝液を、濾紙を用いて除いた。固体物を、減圧下にて、パラジウム／金でコーティングした。コーティングした試料を、ETEC自動走査電子顕微鏡を用いて分析した。

【0316】

（実施例53）

（Rituximab SPPおよびTrastuzumab SPPの電子回析）

40

電子回析法：

電子回析像を、長さ640mmのカメラで、60KVで、4にセットしたスポットサイズにて録画した。

【0317】

（結果）

電子ビームを、実施例2および3の方法に従って作製したRituximab SPPまたはTrastuzumab SPPに焦点を合わせたときに得られた回析パターンは、それぞれ、分析したSPPの領域における結晶の存在を示す。対照的に、電子ビームを、TEMサンプルグリッド上のホルムバール支持ポリマーからなる非結晶個体に焦点を合わ

50

せたとき、非結晶物質を示す回析パターンは得られなかった。

【0318】

発明者らが、本発明の多数の実施形態を記載してきた一方で、本発明の生成物およびプロセスを利用する他の実施形態を提供するために、基本的な実験を変化させ得ることが明らかである。したがって、本発明の範囲は、実施例により表される特定の実施形態ではなく、添付した特許請求の範囲によって規定されるべきであることが理解される。

【図面の簡単な説明】

【0319】

【図1】図1は、記載されるようにして調製された、モノクローナル抗体(Mab)SPPの形態を示す。A:インフリキシマブ(infliximab)(RemicadeTM)SPP(実施例1を参照のこと);B:リツキシマブ(rituximab)(RituxanTM)SPP(実施例2を参照のこと);C:トラスツズマブ(trastuzumab)(HerceptinTM)SPP(実施例3を参照のこと)。
10

【図2】図2は、母液に懸濁したトラスツズマブ(HerceptinTM)抗体SPPのフーリエ変換赤外線スペクトル(FTIR)と、ネイティブの可溶性トラスツズマブ対応物のFTIRとの間の比較を示す。SPPのトラスツズマブ成分は、そのネイティブの可溶性対応物とほぼ同じ二次構造を有し、このことは、トラスツズマブSPPの形成プロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうことも、その元の構造を変化させることもなかったことを示す。実施例14を参照のこと。

【図3】図3は、母液に懸濁したインフリキシマブ(RemicadeTM)抗体SPPのフーリエ変換赤外線スペクトル(FTIR)と、ネイティブの可溶性インフリキシマブ対応物のFTIRとの間の比較を示す。このSPPのインフリキシマブ成分は、そのネイティブの可溶性対応物とほぼ同じ二次構造を有し、このことは、インフリキシマブSPPの形成プロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうことも、その元の構造を変化させることもなかったことを示す。実施例14を参照のこと。
20

【図4】図4は、母液に懸濁したリツキシマブ(RituxanTM)抗体SPPのフーリエ変換赤外線スペクトル(FTIR)と、ネイティブの可溶性リツキシマブ対応物のFTIRとの間の比較を示す。このSPPのリツキシマブ成分は、そのネイティブの可溶性対応物とほぼ同じ二次構造を有し、このことは、リツキシマブSPPの形成プロセスが、インタクトな抗体の完全性を損なうことも、その元の構造を変化させることもなかったことを示す。実施例14を参照のこと。
30

【図5】図5は、4°センチグレードにおける、ネイティブの可溶性リツキシマブの安定性と比較した、溶解したリツキシマブSPPから得られたリツキシマブ(RituxanTM)の安定性の分析の結果を示す。実施例20を参照のこと。

【図6】図6は、ヒト乳癌のマウスモデルを処置するためにトラスツズマブSPPを使用することの有効性と、トラスツズマブ結晶を使用することの有効性とを比較するプロットである。ネイティブの可溶性非特異的IgGを、コントロールとして使用した。実施例49を参照のこと。

【図7】図7は、溶解したSPPから得られたリツキシマブ(RituxanTM)およびトラスツズマブ(HerceptinTM)の安定性と、それらのネイティブの可溶性リツキシマブおよびHerceptin対応物とを比較する、SDS-PAGEゲルを示す。実施例20を参照のこと。
40

【図8】図8は、SPPの調製による乳汁タンパク質からの、インフリキシマブ(RemicadeTM)、リツキシマブ(RituxanTM)およびトラスツズマブ(HerceptinTM)の選択的分画化/精製を示す、SDS-PAGEゲルを示す。実施例11を参照のこと。

【図9】図9は、実施例19に従って、溶解リツキシマブSPP(実施例2の方法に従つて作製)から得られたリツキシマブが、RAJ1リンパ腫細胞の直接的細胞傷害性を引き起こしたことを見出すプロットであり、これは同じ条件下でアッセイされたそのネイティブの可溶性リツキシマブ対応物の直接的細胞傷害性に匹敵した。実施例16を参照のこと。
50

【図10】図10は、実施例19に従って、溶解リツキシマブSPP（実施例2の方法に従って作製）から得られたリツキシマブが、RAJILリンパ腫細胞の補体依存性細胞傷害性（CDC）を引き起こしたことを示すプロットであり、これは同じ条件下でアッセイされたそのネイティブの可溶性リツキシマブ対応物のCDCに匹敵した。実施例17を参考のこと。

【図11】図11は、トラスツズマブのCDスペクトルである。実施例47を参考のこと。

【図12】図12は、リツキシマブのCDスペクトルである。実施例47を参考のこと。

【図13】図13は、インフリキシマブのCDスペクトルである。実施例47を参考のこと。

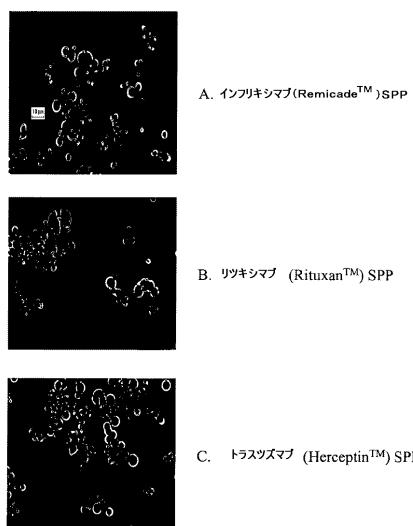
【図14】図14は、溶解SPPから得られたトラスツズマブが抗ヒト抗体に結合する能力と、その可溶性対応物（ネイティブの可溶性トラスツズマブ）のその能力とを比較する、ELISAの結果を示すプロットである。この結果は、トラスツズマブSPPの形成プロセスが、ネイティブのトラスツズマブ抗体のコンフォメーションを変更しなかったことを実証する。実施例48を参考のこと。

【図15】図15は、溶解SPPから得られた、リツキシマブ（上側のプロフィール）およびトラスツズマブ（下側のプロフィール）の糖成分と、そのネイティブの可溶性対応物とを比較する糖プロフィールである。この結果は、溶解抗体SPPから得られた抗体が、そのネイティブの可溶性対応物と同じ糖含量を有することを示し、このことは、リツキシマブSPPおよびトラスツズマブSPPの形成プロセスが、ネイティブのリツキシマブ抗体およびトラスツズマブ抗体の糖含量を変更しなかったことを実証する。実施例50を参考のこと。

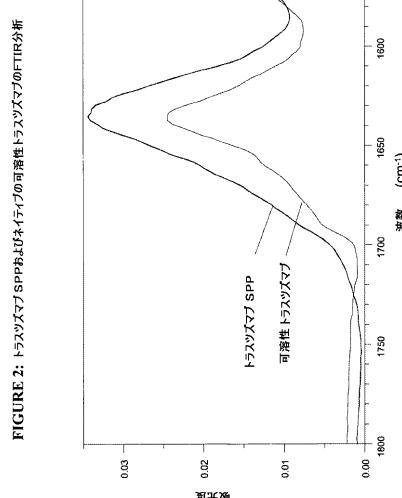
【図16】図16は、実施例25に従って、溶液中に再懸濁したリツキシマブSPPおよびトラスツズマブSPPの安定性と、そのネイティブの可溶性対応物の安定性とを比較する、プロットを示す。

【図1】

FIGURE 1: モノクローナル抗体SPPの形態



【図2】

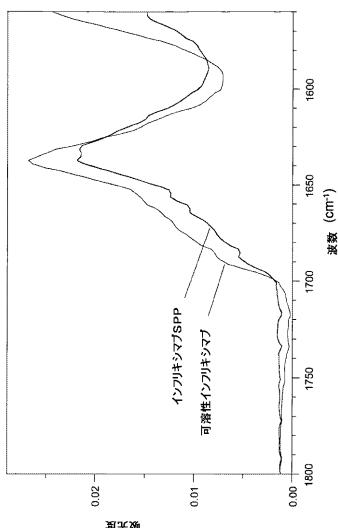


10

20

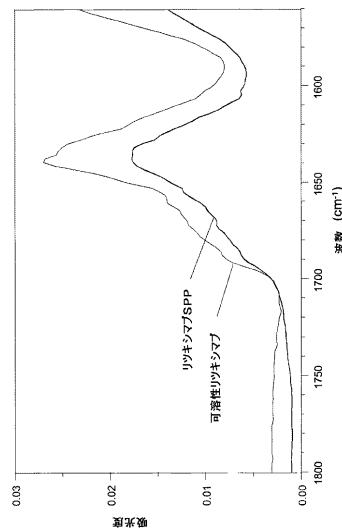
【図3】

FIGURE 3: インクリメントSPPおよびネイティブの可溶性リキシマ



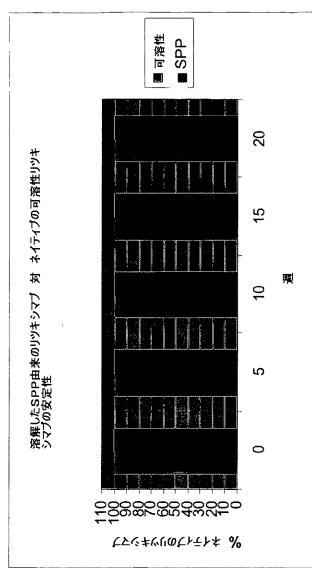
【図4】

FIGURE 4: リキシマ/SPNおよびネイティブの可溶性リキシマのFTIR分析



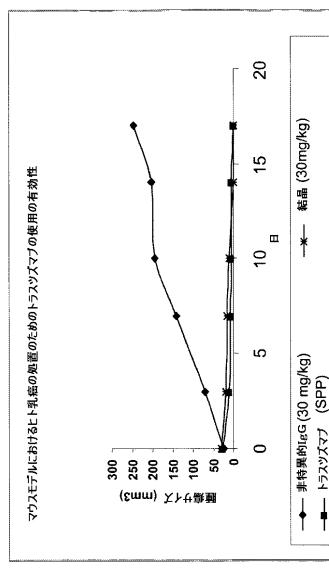
【図5】

FIGURE 5



【図6】

FIGURE 6



【 四 7 】

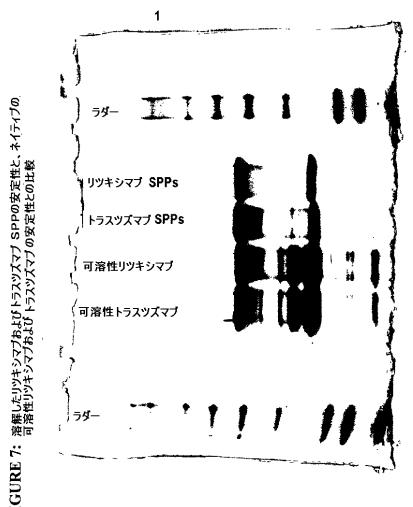


FIGURE 7: 溶解したリキシマブおよびトラヌシマブ SPP の安定性と、ネイティブの可溶性リキシマブおよびトラヌシマブの安定性との比較

【 四 8 】

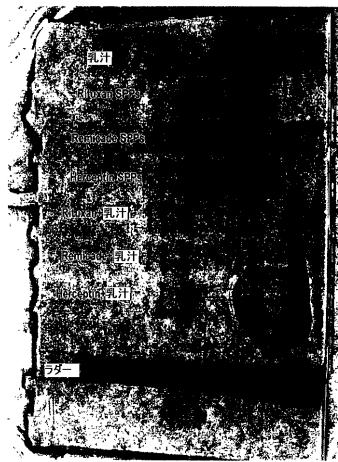


Figure 8: SPPの調製による乳汁タンパク質からのインクリキシマブ(RemicadeTM)、リキシマブ(RituxanTM)およびトランシマブ(HerceptinTM)の選択的分画化／精製

〔 図 9 〕

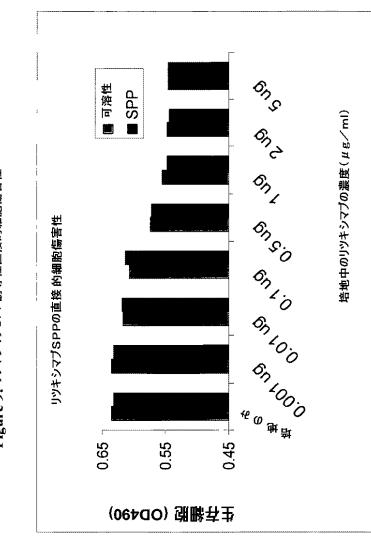


Figure 9: リツキシマブSPP誘導性直達的細胞傷害性

【 図 1 0 】

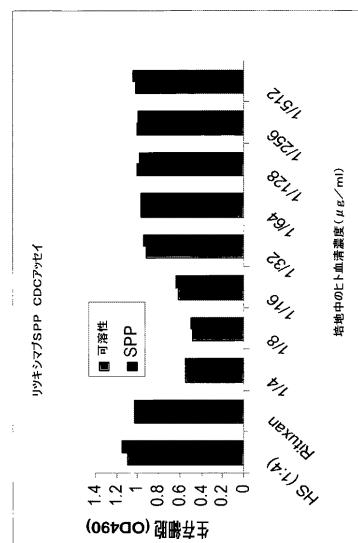
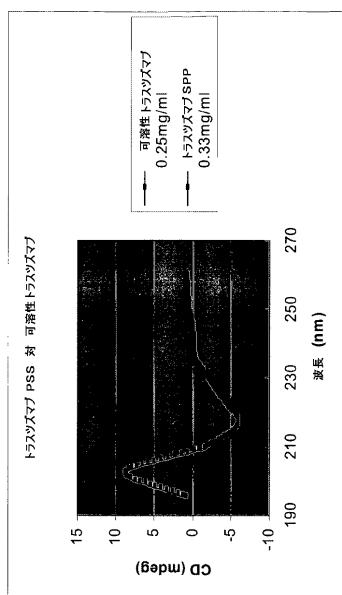
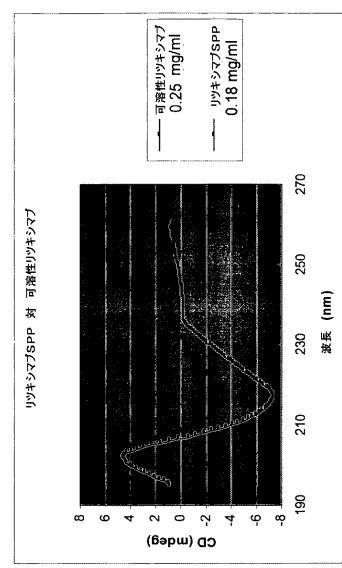


Figure 10: リツキシマブSPP誘導性補体依存性細胞傷害性

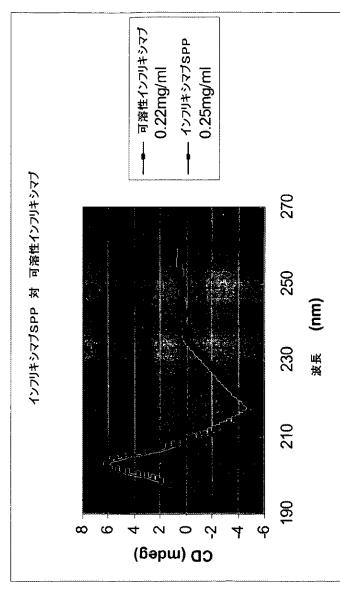
【図 1 1】

Figure 11: ネイティブの可溶性トラスクリシマツと比較した、トラスクリシマツSPPの円偏光
二色(CD)スペクトル

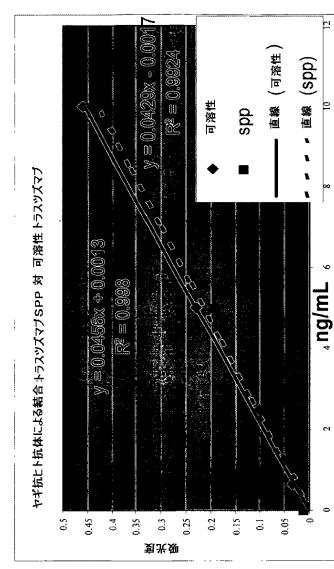
【図 1 2】

Figure 12: ネイティブの可溶性リキシマツと比較した、リキシマツSPPの円偏光
二色(CD)スペクトル

【図 1 3】

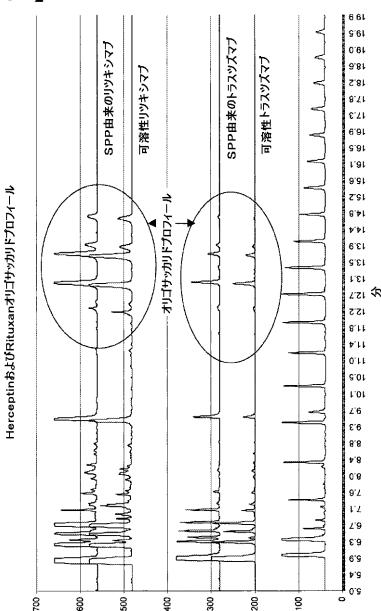
Figure 13: SPPがネイティブの可溶性トラスクリシマツと比較した、インフリキシマツ
SPPの円偏光二色(CD)スペクトル

【図 1 4】

Figure 14: SPPがネイティブの可溶性トラスクリシマツSPPと可溶性トラスクリシマツ
SPPを混合した場合のSPPの溶解能を測定するためのUSA

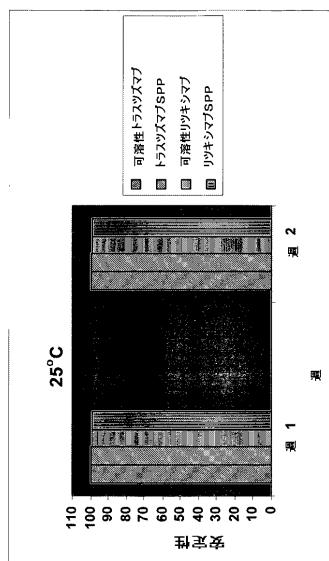
【図15】

Figure 15: SPPを溶解するときに取り扱われるリキシマブ(上部)のクロマトグラムと、ヘレピニン(下部)の各活性物質の比較



【図16】

Figure 16: リキシマブとSPPはトランシスP(SPP)の安定性



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/000014 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(US), CHAMACHKINE, Mikhail [RU/US]; 27 Peabody Terrace, Cambridge, MA 02173 (US). KHALAEF, Nazer [US/US]; 14 Laut Street, Worcester, MA 02458 (US). GOVARDHAN, Chandrika, P. [US/US]; 9 Scotland Road, Lexington, MA 02173 (US). JUNG, Chu, W. [US/US]; 21 Coolidge Road, Arlington, MA 02476 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/19870

(22) International Filing Date: 21 June 2002 (21.06.2002)

(25) Filing Language: English

(74) Agents: HALEY, James, F. et al.; c/o Fish & Neave, 1251 Avenue of the Americas, New York, NY 10020 (US).

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/209,989 21 June 2001 (21.06.2001) US

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, ML, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SF, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): ALTUS BIOLOGICS, INC. [US/US]; 625 Putnam Avenue, Cambridge, MA 02139-4807 (US).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).
[Continued on next page]

(72) Inventors; and

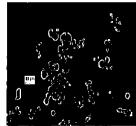
(75) Inventors/Applicants (for US only): YAKOVLEVSKY, Kirill [US/US]; 91 Pine Ridge Road, Waban, MA 02468

(54) Title: SPHERICAL PROTEIN PARTICLES AND METHODS OF MAKING AND USING THEM

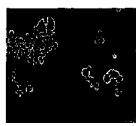


WO 03/000014 A2

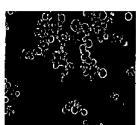
MORPHOLOGY OF MONOCLOINAL ANTIBODY SPPs



A. Infliximab (Remicade™) SPPs



B. Rituximab (Rituxan™) SPPs



C. Trastuzumab (Herceptin™) SPPs

(57) **Abstract:** This invention relates to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins or compositions, including formulations, comprising such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. More particularly, methods are provided for the production of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of high concentration of biologically active proteins, and for the preparation of stabilized SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs for use alone, or in dry or slurry compositions. This invention also relates to methods for stabilization, storage and delivery of biologically active proteins using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. The present invention further relates to methods using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising them, for biomedical applications, including biological delivery to humans and animals. More particularly, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are used as a carrier-free delivery system which can slowly release biologically active proteins to a subject, where and when they are needed.

WO 03/000014 A2



Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, IS, IT, FR, GB, GR, IL, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations: AM, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LK, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, IS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for the following designations: AM, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC,

EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LK, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, IS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (GH, GM, KE, IS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GR, IR, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

SPHERICAL PROTEIN PARTICLES AND METHODS OF MAKING AND
USING THEM

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to spherical protein particles ("SPPs"), spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, methods for producing them and methods and compositions, including formulations, for using them.

More particularly, the present invention further relates to methods using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs for biological delivery to humans and animals. More specifically, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs of this invention can be used to provide alternative dosage/delivery forms, e.g., aerosol, needleless injection, for delivery of biologically active pharmaceutical proteins.

The present invention further relates to methods using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions, including formulations, containing them, for biomedical applications, including more particularly, highly

WO 03/00014

PCT/US02/19870

2

concentrated SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP compositions, including formulations, that are useful for delivery of large amounts of proteins in a small volume to a subject, 5 when and where they are needed. According to one embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are used as a carrier-free delivery system which can slowly release biologically active protein to a 10 subject, where and when they are needed. According to an alternate embodiment of this invention, pharmaceutical ingredients or excipients can be added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs to make compositions comprising 15 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. One embodiment of a composition according to this invention is a formulation. A formulation comprises SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs that are 20 encapsulated in a biocompatible polymeric carrier. In another embodiment, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, and compositions and formulations comprising them, are used for biomedical applications, including delivery of 25 therapeutic proteins and vaccines.

Methods are also provided for preparing stabilized compositions, including formulations, of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, and using such SPPs, spherical 30 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs for biomedical applications, including delivery of therapeutic proteins and vaccines.

Methods are also provided for using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and

WO 03/000014

PCT/US02/19870

3

crystalline SPPs to extract a desired protein of interest from a complex mixture of proteins such as, when the protein is expressed in plant, goat milk, cow milk, cell culture, tissue culture and eggs.

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Protein drugs are generally formulated for parenteral administration, i.e., injection or infusion, because of their extremely poor bioavailability.
10 Parenteral administration of protein drugs usually requires a visit to the doctor or, in some cases, a hospital. As a result, medical care for patients who require parenteral administration of protein drugs is often expensive and time-consuming. Furthermore,
15 patient compliance is often problematic, especially for those patients who require long-term treatment.

To address this problem, needless injection technologies, e.g., needless sub-cutaneous administration, and alternative drug dosage and
20 delivery methods and forms, e.g., dry powder inhalation, skin electroporation, and sustained or controlled release drugs, have been employed.

For use in needless injection technologies and alternative drug dosage and delivery methods and
25 forms, protein drugs must be manufactured as solid particles to achieve the necessary stability. For many applications, the protein particles to be used must have a well-defined narrow size and morphology. For example, for delivery of a protein drug via inhalation,
30 the diameter of the protein particles to be inhaled must be approximately 2-3 microns, if the main site of action, the alveoli, is to be reached. A number of methods have been employed to prepare micron-sized

WO 03/00014

PCT/US02/19870

4

protein particles, including spray-drying, lyophilization and jet milling. These methods are problematic because they typically denature proteins by heat and mechanical stress. Therefore, there is a need 5 for alternative methods of preparing micron-sized or nanometer-sized protein particles without losing biological activity of the protein. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs according to this invention solve this 10 problem, as well as the problems discussed below.

Ruth et al., Acta Crystallographica D56:524-28 (2000) ("Ruth"), which refers to α -L-iduronidase semi-crystalline spherulites that were made using the hanging drop method of crystallization. The α -L- 15 iduronidase spherulites formed when crystallization solutions at pH 3.0-8.5 were used in the presence of calcium or zinc salts. However, during the process of forming spherulites, the α -L-iduronidase protein underwent a conformational change, possibly due to 20 partial denaturation or unfolding of the α -L-iduronidase protein. The methods of the present invention avoid any change of conformation or resulting loss of biological activity.

United States Patent Serial No. 6,063,910 25 (the '910 patent), refers to a method of preparing protein microparticles by supercritical fluid precipitation. That method has a number of shortcomings that are overcome by the present invention. The method disclosed in the '910 patent 30 requires suspending the protein of interest in 90% organic solvent, which is not suitable for a number of proteins. Furthermore, the method disclosed in the '910 patent yields particles that are precipitates, unlike the methods of the present invention, which, in

WO 03/00014

PCT/US02/19870

5

some embodiments, could yield SPPs that are crystalline in nature. In addition, the particles resulting from the method of the '910 patent have a diameter of less than 5 microns, while the SPPs, spherical 5 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of the present invention form particles that range in diameter from about 0.04 to about 200 microns and possibly even larger.

Additional methods of preparing protein
10 particles have also been disclosed, e.g., Bustami R.T. et al., Pharmaceutical Research 17:1360-66 (2000) ("Bustami"). Bustami refers to a method of forming spherical microparticles of proteins using high pressure modified carbon dioxide. The particles formed
15 using the Bustami method are only about 0.1-0.5 microns in diameter, while the method of producing SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of the present invention leads to particles that range in diameter from about 0.04 to
20 about 300 microns. Furthermore, in Bustami, the proteins that were formed into microparticles lost up to 60% (for recombinant human deoxyribonuclease (rhDNase)) of their biological activity as a result. Using the methods of the present invention, no loss of
25 biological activity is expected. Finally, the method of Bustami apparently induces protein aggregation, while the method of the present invention does not.

In principle, dried SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs
30 may also be prepared by lyophilization. See, e.g. Morita T. et al., Pharmaceutical Research 17:1367-73 (2000) ("Morita"). Morita refers to a method of forming spherical fine protein microparticles through lyophilization of a protein-polyethylene glycol (PEG)

WO 03/000014

PCT/US02/19870

6

aqueous mixture. The method in Morita relies on phase separation (unlike the methods herein) followed by lyophilization to yield spheres that have a diameter of 2-3 microns. The methods of the present invention 5 invention lead to the formation of distinct particles that can be isolated by centrifugation, filtration or lyophilization. Also, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of the present invention form particles that range in 10 diameter from about 0.04 to about 300 microns. Furthermore, the method disclosed in Morita requires the addition of organic solvents, e.g., methylene chloride, to remove the PEG used in a previous step, which, as stated above, is not suitable for a number of 15 proteins. In addition, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of the present invention are suitable for transfer out of the mother liquor used in their formation and into other solvents, e.g. aqueous isopropyl alcohol. Also, 20 the method disclosed in Morita requires the use of PEG, which may or may not stabilize the protein being used. In contrast, the methods of this invention allow for the use of reagents other than PEG, that may be more capable of stabilizing the protein of interest. For 25 example, the methods of this invention may utilize ammonium sulfate, which generally stabilizes proteins, and which cannot be used in the method disclosed in Morita.

Another limitation of the Morita method is 30 that the disclosed technique involves rapid cooling of the material and can be applied only to freeze stable products. The aqueous solution is first frozen to between -40 and -50°C. Then, the ice is removed under vacuum. Ice formation is usually destructive to the

WO 03/00014

PCT/US02/19870

7

protein crystal lattice, which destabilizes the protein molecule, and sometimes leads to the formation of amorphous precipitate. The methods of the present invention avoid this problem.

5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the above-described obstacles.

More particularly, the present invention relates to a simple, efficient, high yield method of 10 making SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs that range in size from about 0.5 to about 50 microns in diameter, more preferably from about 0.04 to about 300 microns in diameter. The SPPs, spherical nanocrystalline 15 composite particles and crystalline SPPs can be made in batches enabling downstream processing of proteins, the extraction of a protein of interest and removal of aggregates. Buffers, e.g., glycine, sodium acetate, phosphate, citrate, Tris, borate, and protein 20 crystallizing agents, e.g., precipitants such as ammonium sulfate, polyethylene glycol (PEG), PEG monomethyl ether, sodium formate, and sometimes other additives, e.g., propylene or ethylene glycol, appear to be important to the successful formation of SPPs, 25 spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs according to this invention. These reagents are added slowly to bring about a very gradual increase in the concentration of the precipitating agents. Although dialysis is particularly suited for 30 this purpose, direct addition in a controlled manner will also yield SPPs, spherical nanocrystalline

WO 03/000014

PCT/US02/19870

composite particles and crystalline SPPs according to this invention.

In the methods of this invention, reagents such as ammonium sulfate, polyethylene glycol (PEG), 5 PEG monomethyl ether (PEG MME) and sodium formate, that tend to cause immediate precipitation if they are directly applied to protein solutions, are instead allowed to equilibrate slowly over time by dialysis. In essence, a more concentrated crystallization buffer 10 is allowed to pass slowly through a dialysis membrane, where it equilibrates with a less concentrated solution that contains the protein of interest. Over time, this process raises the effective concentration of the protein of interest, thereby causing a slow 15 precipitation that leads to the formation of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs.

An important element of this process is that the protein be in a buffer that can support pH at a 20 particular level, e.g. sodium acetate at pH 5.5. Furthermore, certain additives, e.g. propylene glycol, appear to be important for the successful formation of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs. The methods of this invention are 25 applicable to a broad range of proteins having wide ranges of molecular weight (MW), isoelectric point (pI) and purity. Proteins suitable for this method include, but are not limited to, antibodies and antibody fragments, glycoproteins, enzymes, protein 30 hormones, viruses and viral proteins, receptors, diagnostic proteins and peptides. The methods of this invention permit production of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs for a number of monoclonal antibodies and heavily

WO 03/000014

PCT/US02/19870

9

glycosylated glycoproteins with pI's that vary from about 4.0 to about 10.0. SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs of the present invention are quite stable and 5 retain full solubility, even in dilute buffer systems.

A further embodiment of this invention relates to a method whereby specific proteins may be purified away from complex protein mixtures, e.g., when protein is expressed in cells including, *inter alia*, 10 bacteria, eggs, goat and cow's milk, plants, cell and tissue culture etc.

A further embodiment relates to a method of removing aggregated proteins from solutions containing aggregated and non-aggregated proteins.

15 A further embodiment of this invention includes crosslinked and/or encapsulated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs.

This invention also relates to SPPs, 20 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions, including formulations, comprising SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins.

25 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 depicts the morphology of monoclonal antibody (Mab) SPPs, prepared as described.

A: Infliximab (Remicade™) SPPs (see Example 1);
B: Rituximab (Rituxan™) SPPs (see Example 2);
30 C: Trastuzumab (Herceptin™) SPPs (see Example 3).

Figure 2 depicts a comparison between the Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) of

WO 03/00014

PCT/US02/19870

10

Trastuzumab (Herceptin™) antibody SPPs suspended in mother liquor and FTIR of the native, soluble Trastuzumab counterpart. The Trastuzumab component of the SPPs had about the same secondary structure as its native, soluble counterpart, indicating that the process of forming Trastuzumab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native structure. See Example 14.

Figure 3 depicts a comparison between the Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) of Infliximab (Remicade™) antibody SPPs suspended in mother liquor and FTIR of the native, soluble Infliximab counterpart. The Infliximab component of the SPPs had about the same secondary structure as its native, soluble counterpart, indicating that the process of forming Infliximab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native structure. See Example 14.

Figure 4 depicts a comparison between the Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR) of Rituximab (Rituxan™) antibody SPPs suspended in mother liquor and FTIR of the native, soluble Rituximab counterpart. The Rituximab component of the SPPs had about the same secondary structure as its native, soluble counterpart, indicating that the process of forming Rituximab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native structure. See Example 14.

Figure 5 depicts the results of an analysis of the stability of Rituximab (Rituxan™) obtained from dissolved Rituximab SPPs compared with the stability of native, soluble Rituximab at 4° Centigrade. See Example 20.

Figure 6 is a plot comparing the efficacy of using Trastuzumab SPPs for treating a mouse model of human breast cancer with that of Trastuzumab crystals.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

11

Native, soluble, non-specific IgG was used as a control. See Example 49.

Figure 7 shows an SDS-PAGE gel comparing the stability of Rituximab (Rituxan™) and Trastuzumab (Herceptin™) obtained from dissolved SPPs with the stability of their native, soluble Rituximab and Herceptin counterparts. See Example 20.

Figure 8 shows an SDS-PAGE gel depicting the selective fractionation/purification of Infliximab (Remicade™), Rituximab (Rituxan™) and Trastuzumab (Herceptin™) from milk proteins by preparation of SPPs. See Example 11.

Figure 9 is a plot showing that Rituximab obtained from dissolving Rituximab SPPs (made according to the method of Example 2) according to Example 19 induced Direct Cytotoxicity of RAJI lymphoma cells that was comparable to that of its native, soluble Rituximab counterpart assayed under identical conditions. See Example 16.

Figure 10 is a plot showing that Rituximab obtained from dissolving Rituximab SPPs (made according to the method of Example 2) according to Example 19 induced Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) of RAJI lymphoma cells that was comparable to that of its native, soluble Rituximab counterpart assayed under identical conditions. See Example 17.

Figure 11: CD spectra of Trastuzumab. See Example 47.

Figure 12: CD spectra of Rituximab. See Example 47.

Figure 13: CD spectra of Infliximab. See Example 47.

Figure 14: A plot showing the results of an ELISA comparing the ability of Trastuzumab obtained

WO 03/000014

PCT/US02/19870

12

from dissolving SPPs to bind anti-human antibodies with that of its soluble counterpart (native, soluble Trastuzumab). The results demonstrate that the process of forming Trastuzumab SPPs did not alter the 5 conformation of the native Trastuzumab antibody. See Example 48.

Figure 15: Carbohydrate profiles comparing the carbohydrate constituents of Rituximab (top profile) and Trastuzumab (bottom profile), obtained 10 from dissolving SPPs, versus their native, soluble counterparts. The results show that the antibodies obtained from dissolving antibody SPPs have the same carbohydrate content as their native, soluble counterparts, demonstrating that the process of forming 15 Rituximab and Trastuzumab SPPs did not alter the carbohydrate content of the native Rituximab and Trastuzumab antibodies. See Example 50.

Figure 16 shows a plot comparing the stability of Rituximab and Trastuzumab SPPs resuspended 20 in solutions according to Example 25 with that of their native, soluble counterparts.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order that the invention herein described may be more fully understood, the following detailed 25 description is set forth. In the description, the following terms are employed:

Amorphous solid -- a non-crystalline solid form of protein, sometimes referred to as amorphous precipitate, which has no molecular lattice structure 30 characteristic of the crystalline solid state.

Antibody -- a glycoprotein of approximate MW 150 kD that is produced by the so-called humoral arm of

WO 03/00014

PCT/US02/19870

13

the immune system of vertebrates in response to the presence of foreign molecules in the body. Antibodies are essential for the prevention and resolution of infection by microorganisms, e.g. parasites, bacteria and viruses. Antibodies perform this function by recognizing and binding, in a highly specific manner, protein (or, sometimes, other organic molecules including polysaccharides, glycoproteins, lipids, or nucleic acids) configurations called antigens (or epitopes) on invading microorganisms and their products. Antibodies bind their target antigens through highly specific interactions between hypervariable domains, called antigen-binding sites, on the antibody, and the epitope itself. Upon binding to the antigen, antibodies activate one or more of the many effector systems of the immune system that contribute to the neutralization, destruction and elimination of the infecting microorganism.

Antibodies are also used for the treatment of cancer, inflammation, cardiovascular disease, and transplant rejection, by their specific binding and subsequent neutralization of the cellular targets, which are involved in disease states. For example, the monoclonal antibody Infliximab binds to tumor necrosis factor and neutralizes its role in inflammation by blocking its interaction with cell surface receptor; while Rituximab targets malignant B lymphocytes by binding to their cell surface CD20 antigen.

Examples of specific antibodies that may be incorporated into SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions, including formulations, comprising them, according to this invention include, *inter alia*, anti-TNF antibodies, anti-CD3 antibodies, anti-CD20

WO 03/000014

PCT/US02/19870

14

antibodies, anti-CD25 antibodies, anti-CD33
antibodies, anti-CD40 antibodies anti-HER2 antibodies,
anti-HBV antibodies, anti-HAV antibodies, anti-HCV
antibodies, anti-GPIIb/IIIa receptor antibodies, anti-
5 RSV antibodies, anti-HIV antibodies, anti-HSV
antibodies and anti-EBV antibodies.

A single antibody molecule has a structure composed of two identical heavy chains (each of approximate MW 50 kD) covalently bound to each other, 10 and two identical light chains (each of approximate MW 25 kD), each covalently bound to one of the heavy chains. The four chains are arranged in a classic "Y" motif. The bottom "leg" of the "Y" is called the Fc region ("c" stands for "crystallizable") and is used to 15 anchor the antibody within cell membranes, and also to bind macrophage cells and activate complement. The two "arms" at the top of the "Y" are called Fab regions (the "ab" stands for "antigen-binding"). Each Fab region contains a constant region (at the juncture of 20 the Fab and the Fc regions) and a variable region (which extends to the tip of the "Y"). Each variable region contains identical antigen-binding sites (at regions within the variable regions called "hypervariable" regions) at each tip of the "Y". Thus, 25 each Fab region has one antigen-binding site, and the complete antibody molecule therefore has two antigen-binding sites (i.e., is "bispecific"). The two antigen-binding sites on a naturally occurring antibody are identical to each other, and therefore the antibody 30 is specific for one antigen (i.e., is "mono-specific"). A number of molecular fragments of antibody molecules have been isolated to date. These do not occur naturally, but are engineered from one or more complete antibody molecules. These fragments include Fab

WO 03/000014

PCT/US02/19870

15

fragments (a single Fab that is isolated from a complete antibody by digestion with the enzyme papain), and F(ab')₂ fragments (two Fabs covalently-bound to each other, produced by digesting the antibody with the 5 enzyme pepsin). Fab fragments are monospecific, while F(ab')₂ fragments are bispecific. Recently, a number of engineered antibody fragments have been introduced. These include double-stranded Fv (dsFv) fragments and 10 single-chain Fv (scFv) fragments (the "v" stands for "variable" in both cases). A dsFv fragment consists of an Fab fragment minus the constant regions, i.e., consisting only of the variable regions of a heavy and light chain covalently bound to each other. A scFv fragment is a single polypeptide chain, consisting the 15 variable region of a heavy chain linked via a peptide linker to the variable region of a light chain. Classically, both the dsFv and the scFv are monovalent (and thus mono-specific). However, two dsFv fragments or two scFv fragments can themselves be linked to form 20 a bispecific fragment (which would be analogous to an F(ab')₂ fragment without the constant regions). Furthermore, it is possible to link two dsFv fragments or scFv fragments with different antigen-binding sites (i.e., different specificities), to form a bi-specific 25 fragment. Such fragments may be used as either research tools or therapeutic or diagnostic reagents.

There are five classes of antibodies (also called immunoglobulins) in humans: IgG, IgM, IgA, IgD, and IgE, each with its own unique characteristics and 30 function. IgG, IgD, and IgE are all made up of one antibody molecule, while IgA can be made up of one, two or three such molecules and IgM consists of five. Furthermore, in humans, there are four subclasses of IgG (IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4), and two subclasses

WO 03/00014

PCT/US02/19870

16

each of IgM and IgA (1 and 2, respectively). For example, the monoclonal antibody Rituximab (Rituxan™) is an IgG1 antibody.

Though naturally occurring antibodies are derived from a single species, engineered antibodies and antibody fragments may be derived from more than one species of animal, i.e., may be chimeric. To date, mouse (murine)/human chimeric antibodies have been generated, though other species combination are possible. Chimeric antibodies have been further broken down into two subtypes: chimeric and humanized. Chimeric murine/human antibodies contain approximately 75% human and 25% mouse amino acid sequences, respectively. The human sequences represent the constant regions of the antibody while the mouse sequences represent the variable regions (and thus contain the antigen-binding sites) of the antibody. The rationale for using such chimeras is to retain the antigen specificity of the mouse antibody but reduce the immunogenicity of the mouse antibody (a murine antibody would cause an immune response against it in species other than the mouse) and thus be able to employ the chimera in human therapies. Chimeric antibodies also include those which comprise CDR regions from different human antibodies.

Alternatively, chimeric antibodies comprise framework regions from one antibody and CDR regions from another antibody. Chimeric antibodies also include those which comprise CDR regions from at least two different human antibodies. Humanized antibodies contain approximately 90% (or more) human amino acid sequences. The only murine sequences present are those for the hypervariable region (that are the actual antigen-binding sites contained within the variable

WO 03/000014

PCT/US02/19870

17

region). Humanized antibodies have minimal mouse immunogenicity as compared with chimeric antibodies.

Engineered antibodies and antibody fragments also include, *inter alia*, non-glycosylated antibodies and antibody fragments.

There are generally two types of antibodies that can be distinguished by their specificities: polyclonal antibodies and monoclonal antibodies. Polyclonal antibodies are those that are found as the 10 immunoglobulin fraction of blood, and are essentially a polyclonal mixture of many different types of antibodies specific for the different antigens the individual has been exposed to (i.e., they originate from many different clones of B lymphocytes (or B 15 cells), the cell that produces antibodies).

Monoclonal antibodies are antibodies of a single specificity, i.e., that are derived from a single clone of B lymphocytes (B cells). These 20 antibodies have exquisite specificity for their target antigens and also can be produced in high amounts (i.e., high titres). They are useful as markers for specific antigens (e.g., cancer antigens), as diagnostic agents (e.g., in assays to detect viruses like HIV-1), and as therapeutic agents. Intact 25 monoclonal antibodies are those that have a classic molecular structure that includes two complete heavy chains and two complete light chains. This is distinguished from antibody fragments, such as Fab, F(ab')₂, Fc fragments, dsFv fragments, and scFv 30 fragments.

Traditionally, monoclonal antibodies have been produced by fusing the antibody-producing B cell with an immortal hybridoma cell to generate B cell hybridomas, which continually produce monoclonal

WO 03/000014

PCT/US02/19870

18

antibodies in cell culture. Currently, however, monoclonal antibodies may be produced *in vivo* in large quantities in genetically-modified animals, such as cows and goats (Genzyme Transgenics), pigs and rabbits (Pharmingen, PPL Therapeutics), chickens (Tranxenogen), and in plants, such as tobacco and corn (Epicyte, Integrated Protein Technologies, Meristem Croptech, and others). For example, large amounts of monoclonal antibodies can be found in the milk of goats (Genzyme Transgenics). Antibodies from all such sources may be used to prepare SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs according to this invention. Furthermore, as a result of transgenics, mice have been modified to contain and express the entire human B cell genome (which encodes human antibodies). Therefore, such transgenic mice (Abgenix) are a source of human antibodies according to this invention. It should be noted that glycosylation is specific to the animal that is producing the antibodies. For example, this means that human antibodies from sources other than humans will have subtly different glycosylation profiles. Therefore, the intact antibodies or single-chain Fv fragments useful in this invention may display modified glycosylation or be deglycosylated. Antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles and crystalline antibody SPPs which may be generated according to this invention also include derivatized antibodies. Such antibodies include those derivatized with polyethylene glycol or at least one carbohydrate moiety or least one methyl or ethyl group.

Clinically relevant antibodies may also be classified according to the therapeutic area in which they are to be employed. Such antibodies include, for

WO 03/000014

PCT/US02/19870

19

example, those for treating cancers (e.g., pancreatic cancer), inflammatory diseases (e.g., autoimmune diseases, arthritis), cardiovascular diseases (e.g., strokes), infectious disease (e.g., HIV/AIDS),
5 respiratory diseases (e.g., asthma), tissue transplantation rejection and organ transplantation rejection. Such antibodies also include antibodies for radioimmunotherapy. Antibodies which may be crystallized according to the present invention
10 include, for example, Abciximab, Palivizumab, Murumonab-CD3, Gemtuzumab, Trastuzumab, Basiliximab, Daclizumab, Etanercept and Zevalin.

15 Antibody activity release rate -- the quantity of intact antibody dissolved per unit time.
The quantity of single chain Fv antibody fragment dissolved per unit time is the "single-chain Fv antibody fragment release rate".

20 Antibody SPP -- an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP that is formed by the slow, controlled precipitation of an antibody or a combination of antibodies. Antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or crystalline antibody SPPs may be combined with any other pharmaceutically or diagnostically acceptable second component to form a composition.
25 Alternatively, antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or crystalline antibody SPPs may encapsulated within a polymeric carrier to form coated particles (a formulation, which is one embodiment of a composition).

30 Alternatively, antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles, crystalline antibody SPPs, or compositions or formulations thereof, may be formed from antibody

WO 03/000014

PCT/US02/19870

20

fragments including, *inter alia*, single-chain Fv antibody fragments.

Antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or crystalline antibody 5 SPPs have a spherical morphology and have a size range of from about 0.04 to about 300 microns in diameter.

Antigen -- any substance or material that is specifically recognized by an antibody. Antigens are typically small pieces of proteins (peptides) found on 10 the surfaces of cells or invading microorganisms.

Antibodies are thought to specifically recognize antigens as small as four amino acids in length, and the substitution of only one amino acid can abolish antibody recognition of that particular antigen.

15 Antigenicity -- the ability of an antigen to be bound by an antibody that has been raised previously against that antigen. An antigen is said to be in its antigenic conformation when it can be bound by the antibody targeted to it. This is different from 20 immunogenicity, which is the ability of an antigen to elicit the production of antibodies that will in turn neutralize the microorganism displaying that antigen in its native conformation.

25 Anti-idiotypic antibody -- antibodies having specificity for the antigen-binding sites of other antibodies. Anti-idiotypic antibodies are generated in the following manner: an antigen elicits the production of antibodies (called Ab-1 or idiotypes) that are specific for that antigen. These antibodies 30 (idiotypes) are then used as immunogens themselves to elicit a second generation of antibodies that are specific for Ab-1. These second generation antibodies (Ab-2) are called anti-idiotypic antibodies (or anti-idiotypes), and either mimic, or are closely related

WO 03/000014

PCT/US02/19870

21

to, the initial antigen used to generate Ab-1. Such reactions also occur naturally *in vivo*, in response to antigenic stimulation, and by means of these antibody-antibody interactions, the immune system is able to, in essence, interact with itself. It has been postulated that by exploiting this capability, anti-idiotypic antibodies can be used to prevent certain infections, and treat some kinds of cancers and various immune and autoimmune diseases.

10 Antibody half-life -- for antibodies *in vivo*, the time in which a given amount of antibodies are reduced to 50% of its initial concentration. IgG typically has a half-life of about 21 days (though IgG3 has a half-life of only 7 days), while IgM, A, D, and E 15 have typical half-lives of 10 days, 6 days, 3 days, and 2 days, respectively. The time in which a given amount of a single chain Fv antibody fragment is reduced to 50% of its initial concentration is "the single chain Fv antibody fragment half-life".

20 Antibody loading -- the antibody content of compositions, including formulations, of antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or crystalline SPPs, as calculated as a percentage by weight of antibody relative to the weight of the dry 25 composition. A typical range of antibody loading is from about 1% to about 80%. The single chain Fv antibody fragment content of compositions, including formulations, of Fv antibody fragment SPPs, spherical nanocrystalline composite Fv antibody fragment 30 particles or crystalline Fv antibody fragment SPPs, as calculated as a percentage by weight of the fragment relative to the weight of the dry composition is "the single chain Fv antibody fragment loading."

Antibody release -- the release of active protein from a polymeric carrier, as controlled by one or more of the following factors: (1) degradation of the polymer matrix; (2) rate of crystal dissolution within the polymer matrix; (3) diffusion of dissolved protein through the polymer matrix; (4) protein loading; and (5) diffusion of biological medium into the antibody crystal/polymer matrix.

Biocompatible polymers -- polymers that are non-antigenic (when not used as an adjuvant), non-carcinogenic, non-toxic and which are not otherwise inherently incompatible with living organisms. Examples include: poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters) such as poly (lactic acid) or PLA, poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (β -hydroxybutyrate), poly (caprolactone) and poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly (hydroxypropyl)methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccarides, glycaminoglycans, sulfated polysaccharides, blends and copolymers thereof.

Biodegradable polymers -- polymers that degrade by hydrolysis or solubilization. Degradation can be heterogenous -- occurring primarily at the particle surface, or homogenous -- degrading evenly throughout the polymer matrix, or a combination of such processes.

Bioimmunoassay for the Determination of Biological Activity of Antibodies - Any immunoassay

WO 03/00014

PCT/US02/19870

23

that may be used to determine the biological activity of an antibody, including, *inter alia*, direct cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

5 (ADCC). See Examples 15-18 and Figures 9 and 10.

Biological macromolecule -- biological polymers such as proteins, deoxyribonucleic acids (DNA) and ribonucleic acids (RNA). For the purposes of this application, biological macromolecules are also

10 referred to as macromolecules.

Complement - the collective term for about 20 enzymes, proenzymes and other proteins that form one of the principal effector mechanisms of immunity.

15 Although antigen-nonspecific in itself, the complement system is a final effector mechanism of highly specific antibody-mediated immune responses.

Composition - A mixture of different components sustained in a defined ratio. An SPP composition, spherical nanocrystalline composite 20 particle composition or crystalline SPP composition comprises an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP in combination with one or more pharmaceutically or diagnostically acceptable ingredient or excipients, including sugars and 25 biocompatible polymers. One embodiment of a composition is a formulation, which is an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP according to this invention, which has been encapsulated within a polymeric carrier to form 30 coated particles (i.e., a composition wherein at least one of the ingredients added to an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP is a polymer). Examples of excipients are described in the *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, published

jointly by the American Pharmaceutical Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain. A "formulation-for-decontamination" is a formulation selected from the group consisting of: formulations for decontamination of chemical wastes, herbicides, insecticides, pesticides and environmental hazards.

Controlled dissolution -- dissolution of a SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP of a protein, including, *inter alia*, an intact antibody or a single chain Fv antibody fragment, or of a composition or formulation comprising such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, in a controlled manner. Dissolution is controlled by a factor selected from the group consisting of the following: the surface area of said SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP; the size of said SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP; the shape of said SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, the concentration of the excipient component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP composition or formulation; the number and nature of excipient components; the molecular weight of the excipient components, the nature of polymeric carriers, and combinations thereof.

Co-polymer -- a polymer made with more than one monomer species.

Crystal -- crystals, e.g., crystalline SPPs or nanocrystals (single nanocrystals or aggregates of nanocrystals form spherical nanocrystalline composite particles), are one form of the solid state of matter, which is distinct from a second form -- the amorphous solid state, which exists essentially as an unorganized

WO 03/000014

PCT/US02/19870

25

solid. Crystals are regular three-dimensional arrays of atoms, ions, molecules (e.g., proteins such as antibodies), or molecular assemblies (e.g., antigen/antibody complexes). Crystals are lattice arrays of building blocks called asymmetric units (which consist of the substance to be crystallized) that are arranged according to well-defined symmetries into unit cells that are repeated in three-dimensions. See Giegé, R. and Ducruix, A. *Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2nd ed., pp. 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999).

Diagnostically effective amount -- an amount of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or a composition or formulation thereof, which is effective to diagnose an infection by a microorganism, in a living organism to whom it is administered over some period of time.

Drying of SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs -- removal of water, organic solvent or liquid polymer by means including drying with N₂, air or inert gases, vacuum oven drying, lyophilization, washing with a volatile organic solvent followed by evaporation of the solvent, or evaporation in a fume hood. Typically, drying is achieved when the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs become a free flowing powder. Drying may be carried out by passing a stream of gas over wet SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. The gas may be selected from the group consisting of: nitrogen, argon, helium, carbon dioxide, air or combinations thereof.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

26

Effective amount -- an amount of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP or a composition or formulation thereof, which is effective to treat, immunize, boost, 5 protect, repair or detoxify the subject or area to which it is administered over some period of time.

Emulsifier -- a surface active agent which reduces interfacial tension between SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 10 and a solution. Alternatively, an emulsifier would reduce interfacial tension between polymer-coated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and a solution.

Glycoprotein -- a protein or peptide 15 covalently linked to a carbohydrate. The carbohydrate may be monomeric or composed of oligosaccharides.

Homo-polymer -- a polymer made with a single monomer species.

Immunotherapeutic proteins -- a protein is 20 immunotherapeutic when it has the activity of inducing protective immunity to a tumor cell, virus, or bacteria or stimulating the immune system to reduce or eliminate said tumor cell, virus or bacteria.

Insoluble and stable form -- a form of SPP, 25 spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP which is insoluble in aqueous solvents, organic solvents or aqueous-organic solvent mixtures and which displays greater stability than the soluble form of the protein component of the SPP, spherical 30 nanocrystalline composite particle or crystalline SPP. In any embodiment, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs may be active in insoluble form. And in one embodiment, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or

WO 03/000014

PCT/US02/19870

27

crystalline SPPs may be active in insoluble form, then dissolve or are removed or digested once their function is complete.

Label -- incorporation of a label to an SPP, 5 spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP. Labels may be selected from the group consisting of radiolabels, enzyme labels, toxins, magnetic agents or drug conjugates.

Liquid polymer -- pure liquid phase synthetic 10 polymers, such as poly-ethylene glycol (PEG), in the absence of aqueous or organic solvents.

Macromolecules -- proteins, glycoproteins, peptides, therapeutic proteins, DNA or RNA molecules.

Method of Administration -- SPPs, spherical 15 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising them, may be appropriate for a variety of modes of administration. These include oral and parenteral administration. Examples of parenteral administration 20 include, but are not limited to, subcutaneous, intravenous, transdermal, intramuscular, pulmonary inhalation, intralesional, topical administration, needleless injection, sub-cutaneous injection, needleless sub-cutaneous administration, or aerosol 25 delivery.

Mother Liquor -- the preparation buffer used to make SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of macromolecules, e.g., proteins, nucleic acids.

Organic solvents -- any solvent of non-aqueous origin, including liquid polymers and mixtures thereof. Organic solvents suitable for the present invention include: acetone, methyl alcohol, methyl isobutyl ketone, chloroform, 1-propanol, isopropanol,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

28

2-propanol, acetonitrile, 1-butanol, 2-butanol, ethyl alcohol, cyclohexane, dioxane, ethyl acetate, dimethylformamide, dichloroethane, hexane, isoctane, methylene chloride, tert-butyl alcohol, toluene, 5 carbon tetrachloride, or combinations thereof.

Peptide -- a polypeptide of small to intermediate molecular weight, usually 3 to 35 amino acid residues and frequently but not necessarily representing a fragment of a larger protein.

10 Pharmaceutically effective amount -- an amount of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or a composition or formulation thereof, which is effective to treat a condition in a living organism to whom it is 15 administered over some period of time.

20 Prophylactically effective amount -- an amount of a SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or a composition or formulation thereof, which is effective to prevent an infection in an individual to whom it is administered over some period of time.

Ingredients -- any excipient or excipients, including pharmaceutical ingredients or excipients. Excipients include, for example, the following:

25 Acidifying agents
acetic acid, glacial acetic acid, citric acid, fumaric acid, hydrochloric acid, diluted hydrochloric acid, malic acid, nitric acid, phosphoric acid, diluted phosphoric acid, sulfuric acid, tartaric 30 acid

Aerosol propellants

WO 03/000014

PCT/US02/19870

29

butane, dichlorodifluoromethane,
dichlorotetrafluorocethane, isobutane, propane,
trichloromonofluoromethane

Air displacements

5 carbon dioxide, nitrogen

Alcohol denaturants

denatonium benzoate, methyl isobutyl ketone,
sucrose octacetate

Alkalizing agents

10 strong ammonia solution, ammonium carbonate,
diethanolamine, diisopropanolamine, potassium
hydroxide, sodium bicarbonate, sodium borate, sodium
carbonate, sodium hydroxide, trolamine

Anticaking agents (see *glidant*)

15 Antifoaming agents
dimethicone, simethicone

Antimicrobial preservatives

benzalkonium chloride, benzalkonium chloride
solution, benzethonium chloride, benzoic acid, benzyl
20 alcohol, butylparaben, cetylpyridinium chloride,
chlorobutanol, chlorocresol, cresol, dehydroacetic
acid, ethylparaben, methylparaben, methylparaben
sodium, phenol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric
acetate, phenylmercuric nitrate, potassium benzoate,
25 potassium sorbate, propylparaben, propylparaben sodium,
sodium benzoate, sodium dehydroacetate, sodium
propionate, sorbic acid, thimerosal, thymol

WO 03/00014

PCT/US02/19870

30

Antioxidants

ascorbic acid, acorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, hypophosphorous acid, monothioglycerol, propyl gallate, 5 sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium metabisulfite, sodium thiosulfate, sulfur dioxide, tocopherol, tocopherols excipient

Buffering agents

acetic acid, ammonium carbonate, ammonium 10 phosphate, boric acid, citric acid, lactic acid, phosphoric acid, potassium citrate, potassium metaphosphate, potassium phosphate monobasic, sodium acetate, sodium citrate, sodium lactate solution, dibasic sodium phosphate, monobasic sodium phosphate

15 Capsule lubricants (see tablet and capsule lubricant)

Chelating agents

edetate disodium, ethylenediaminetetraacetic acid and salts, edetic acid

Coating agents

20 sodium carboxymethylcellulose, cellulose acetate, cellulose acetate phthalate, ethylcellulose, gelatin, pharmaceutical glaze, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, methacrylic acid copolymer, 25 methylcellulose, polyethylene glycol, polyvinyl acetate phthalate, shellac, sucrose, titanium dioxide, carnauba wax, microcrystalline wax, zein

Colors

WO 03/00014

PCT/US02/19870

31

caramel, red, yellow, black or blends, ferric
oxide

Complexing agents

ethylenediaminetetraacetic acid and salts

5 (EDTA), edetic acid, gentisic acid ethanolmaide,
oxyquinoline sulfate

Desiccants

calcium chloride, calcium sulfate, silicon
dioxide

10 Emulsifying and/or solubilizing agents

acacia, cholesterol, diethanolamine
(adjunct), glycercyl monostearate, lanolin alcohols,
lecithin, mono- and di-glycerides, monoethanolamine
(adjunct), oleic acid (adjunct), oleyl alcohol
15 (stabilizer), poloxamer, polyoxyethylene 50 stearate,
polyoxyl 35 caster oil, polyoxyl 40 hydrogenated castor
oil, polyoxyl 10 cetyl ether, polyoxyl 20 cetostearyl
ether, polyoxyl 40 stearate, polysorbate 20,
polysorbate 40, polysorbate 60, polysorbate 80,
20 propylene glycol diacetate, propylene glycol
monostearate, sodium lauryl sulfate, sodium stearate,
sorbitan monolaurate, sorbitan monooleate, sorbitan
monopalmitate, sorbitan monostearate, stearic acid,
trolamine, emulsifying wax

25 Filtering aids

powdered cellulose, purified siliceous earth

Flavors and perfumes

anethole, benzaldehyde, ethyl vanillin,
menthol, methyl salicylate, monosodium glutamate,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

32

orange flower oil, peppermint, peppermint oil,
peppermint spirit, rose oil, stronger rose water,
thymol, tolu balsam tincture, vanilla, vanilla
tincture, vanillin

5

Glidant and/or anticaking agents
calcium silicate, magnesium silicate,
colloidal silicon dioxide, talc

Humectants

10 glycerin, hexylene glycol, propylene glycol,
sorbitol

Ointment bases

lanolin, anhydrous lanolin, hydrophilic
ointment, white ointment, yellow ointment, polyethylene
15 glycol ointment, petrolatum, hydrophilic petrolatum,
white petrolatum, rose water ointment, squalane

Plasticizers

castor oil, diacetylated monoglycerides,
diethyl phthalate, glycerin, mono- and di-acetylated
20 monoglycerides, polyethylene glycol, propylene glycol,
triacetin, triethyl citrate

Polymer membranes

cellulose acetate

Solvents

25 acetone, alcohol, diluted alcohol, amylene
hydrate, benzyl benzoate, butyl alcohol, carbon
tetrachloride, chloroform, corn oil, cottonseed oil,
ethyl acetate, glycerin, hexylene glycol, isopropyl
alcohol, methyl alcohol, methylene chloride, methyl

WO 03/000014

PCT/US02/19870

33

isobutyl ketone, mineral oil, peanut oil, polyethylene glycol, propylene carbonate, propylene glycol, sesame oil, water for injection, sterile water for injection, sterile water for irrigation, purified water

5 Sorbents

powdered cellulose, charcoal, purified siliceous earth

Carbon dioxide sorbents
barium hydroxide lime, soda lime

10 Stiffening agents

hydrogenated castor oil, cetostearyl alcohol, cetyl alcohol, cetyl esters wax, hard fat, paraffin, polyethylene excipient, stearyl alcohol, emulsifying wax, white wax, yellow wax

15 Suppository bases

cocoa butter, hard fat, polyethylene glycol

Suspending and/or viscosity-increasing agents

acacia, agar, alginic acid, aluminum monostearate, bentonite, purified bentonite, magma bentonite, carbomer 934p, carboxymethylcellulose calcium, carboxymethylcellulose sodium, carboxymethylcellulose sodium 12, carrageenan, microcrystalline and carboxymethylcellulose sodium cellulose, dextrin, gelatin, guar gum, hydroxyethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, magnesium aluminum silicate, methylcellulose, pectin, polyethylene oxide, polyvinyl alcohol, povidone, propylene glycol alginate, silicon

WO 03/000014

PCT/US02/19870

34

dioxide, colloidal silicon dioxide, sodium alginate,
tragacanth, xanthan gum

Sweetening agents

aspartame, dextrates, dextrose, excipient
5 dextrose, fructose, mannitol, saccharin, calcium
saccharin, sodium saccharin, sorbitol, solution
sorbitol, sucrose, compressible sugar, confectioner's
sugar, syrup

Tablet binders

10 acacia, alginic acid, sodium
carboxymethylcellulose, microcrystalline cellulose,
dextrin, ethylcellulose, gelatin, liquid glucose, guar
gum, hydroxypropyl methylcellulose, methycellulose,
polyethylene oxide, povidone, pregelatinized starch,
15 syrup

Tablet and/or capsule diluents
calcium carbonate, dibasic calcium phosphate,
tribasic calcium phosphate, calcium sulfate,
microcrystalline cellulose, powdered cellulose,
20 dextrates, dextrin, dextrose excipient, fructose,
kaolin, lactose, mannitol, sorbitol, starch,
pregelatinized starch, sucrose, compressible sugar,
confectioner's sugar

Table disintegrants
25 alginic acid, microcrystalline cellulose,
croscarmellose sodium, crospovidone, polacrilin
potassium, sodium starch glycolate, starch,
pregelatinized starch

WO 03/000014

PCT/US02/19870

35

Tablet and/or capsule lubricants
calcium stearate, glyceryl behenate,
magnesium stearate, light mineral oil, polyethylene
glycol, sodium stearyl fumarate, stearic acid, purified
5 stearic acid, talc, hydrogenated vegetable oil, zinc
stearate

Tonicity agent
dextrose, glycerin, mannitol, potassium
chloride, sodium chloride

10 Vehicle: flavored and/or sweetened
aromatic elixir, compound benzaldehyde
elixir, iso-alcoholic elixir, peppermint water,
sorbitol solution, syrup, tolu balsam syrup

Vehicle: oleaginous
15 almond oil, corn oil, cottonseed oil, ethyl
oleate, isopropyl myristate, isopropyl palmitate,
mineral oil, light mineral oil, myristyl alcohol,
octyldodecanol, olive oil, peanut oil, persic oil,
seame oil, soybean oil, squalane

20 Vehicle: solid carrier
sugar spheres

Vehicle: sterile
Bacteriostatic water for injection,
bacteriostatic sodium chloride injection

25 Viscosity-increasing (see *suspending agent*)

WO 03/000014

PCT/US02/19870

36

- Water repelling agent
cyclomethicone, dimethicone, simethicone
- Wetting and/or solubilizing agent
benzalkonium chloride, benzethonium chloride,
5 cetylpyridinium chloride, docusate sodium, nonoxynol 9,
nonoxynol 10, octoxynol 9, poloxamer, polyoxyl 35
castor oil, polyoxyl 40, hydrogenated castor oil,
polyoxyl 50 stearate, polyoxyl 10 oleyl ether, polyoxyl
20, cetostearyl ether, polyoxyl 40 stearate,
10 polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60,
polysorbate 80, sodium lauryl sulfate, sorbitan
monolaureate, sorbitan monooleate, sorbitan
monopalmitate, sorbitan monostearate, tyloxapol
Preferred ingredients or excipients include:
15 Salts of 1) amino acids such as glycine, arginine,
aspartic acid, glutamic acid, lysine, asparagine,
glutamine, proline, 2) carbohydrates, e.g.
monosaccharides such as glucose, fructose, galactose,
mannose, arabinose, xylose, ribose and 3)
20 disaccharides, such as lactose, trehalose, maltose,
sucrose and 4) polysaccharides, such as maltodextrins,
dextrans, starch, glycogen and 5) alditols, such as
mannitol, xylitol, lactitol, sorbitol 6) glucuronic
acid, galacturonic acid, 7) cyclodextrins, such as
25 methyl cyclodextrin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin and
alike 8) inorganic salts, such as sodium chloride,
potassium chloride, magnesium chloride, phosphates of
sodium and potassium, boric acid ammonium carbonate and
ammonium phosphate, and 9) organic salts, such as
30 acetates, citrate, ascorbate, lactate 10) emulsifying
or solubilizing agents like acacia, diethanolamine,
glyceryl monostearate, lecithin, monoethanolamine,
oleic acid, oleyl alcohol, poloxamer, polysorbates,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

37

sodium lauryl sulfate, stearic acid, sorbitan monolaurate, sorbitan monostearate, and other sorbitan derivatives, polyoxyl derivatives, wax, polyoxyethylene derivatives, sorbitan derivatives 11) viscosity
5 increasing reagents like, agar, alginic acid and its salts, guar gum, pectin, polyvinyl alcohol, polyethylene oxide, cellulose and its derivatives propylene carbonate, polyethylene glycol, hexylene glycol, tyloxapol. A further preferred group of
10 excipients or ingredients includes sucrose, trehalose, lactose, sorbitol, lactitol, inositol, salts of sodium and potassium such as acetate, phosphates, citrates, borate, glycine, arginine, polyethylene oxide, polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, hexylene
15 glycol, methoxy polyethylene glycol, gelatin, hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

Polymer -- a large molecule built up by the repetition of small, simple chemical units. The repeating units may be linear or branched to form
20 interconnected networks. The repeat unit is usually equivalent or nearly equivalent to the monomer.

Polymeric carriers -- polymers used for encapsulation of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs for delivery of
25 their protein components, including biological delivery. Such polymers include biocompatible and biodegradable polymers. The polymeric carrier may be a single polymer type or it may be composed of a mixture of polymer types. Polymers useful as the polymeric
30 carrier, include for example, poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters) such as poly (lactic acid) or PLA, poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA, poly (D-hydroxybutyrate), poly

WO 03/00014

PCT/US02/19870

38

(caprolactone) and poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly ((hydroxypropyl)methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-5 alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, natural and synthetic polypeptides, alginate, cellulose and cellulose derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated polysaccharides, modified 10 starches such as amylose starch, amylopectin starch, hydroxyethyl starch, methacrylate starch, and other starches, and any conventional material that is capable of encapsulating protein SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline 15 SPPs.

Protein -- a complex high polymer containing carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen and usually sulfur and composed of chains of amino acids connected by peptide linkages. The molecular weight range for 20 proteins includes peptides of 1000 Daltons to glycoproteins of 600 to 1000 kiloDaltons.

Protein delivery system -- method or means for administering one or more of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP 25 of a protein, or a composition or formulation thereof, to a biological entity.

Prophylactically effective amount -- an amount of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or a composition or 30 formulation thereof, which is effective to prevent an infection by a microorganism, in a living organism to whom it is administered over some period of time.

Radiolabel -- incorporation of a radiolabel to an SPP, spherical nanocrystalline composite particle

WO 03/00014

PCT/US02/19870

39

or crystalline SPP. In situations where the radiolabel has a short half-life, as with ^{131}I or ^{90}Y , the radiolabel can also be therapeutic, e.g., used in radioimmunotherapies against cancers. Various methods 5 of labeling polypeptides and glycoproteins are known in the art and may be used. Examples of labels include, but are not limited to, the following radioisotopes or radionucleotides: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , and ^{131}I .

10 Reconstitution -- dissolution of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs or compositions or formulations thereof, in an appropriate buffer or pharmaceutical excipient or ingredient.

15 Loss of Shelf Stability -- the loss of specific activity and/or changes in secondary or tertiary structure of the protein component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, as compared with the soluble protein 20 counterpart over time incubated under specified conditions.

25 Spherical Protein Particle (SPP) - a discrete protein particle with a morphology that is roughly spherical in nature, and that can be isolated by methods such as centrifugation and filtration. One embodiment of an SPP or a crystalline SPP is a so-called "spherical nanocrystalline composite particle." Spherical nanocrystalline composite particles are protein particles having overall dimensions of about 1 30 to about 300 micrometers (μm) in diameter. Spherical nanocrystalline composite particles comprise protein crystals, called "nanocrystals", having diameters of from about 40 to about 999 nanometers (nm). These protein nanocrystals may be arranged uniformly

WO 03/000014

PCT/US02/19870

40

throughout the larger spherical nanocrystalline composite particle, or arranged in a layered, shell structure. Furthermore, the nanocrystals may be arranged within the spherical nanocrystalline composite 5 particle in such a way as to form pores and channels with openings that are about 1 nm to about 100 nm across (from edge to edge).

Crystalline Spherical Protein Particle (SPP)

- an SPP wherein the protein is in a crystalline form, 10 or is crystalline in nature. A crystalline SPP having a diameter ranging from about 40 nm to about 999 nm would be a "nanocrystalline" SPP.

15 Loss of Stability -- the loss of specific activity and/or changes in the secondary or tertiary structure of the protein component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP as compared with the soluble protein counterpart over time while in solution under specified conditions.

20 Stabilization -- the process of preventing aggregation, the loss of specific activity and/or changes in secondary or tertiary structure of the protein component an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or a crystalline SPP as compared with the soluble protein counterpart, by preparing 25 compositions or formulations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs with excipients or ingredients.

25 Therapeutic SPP, Therapeutic Spherical Nanocrystalline Composite Particle or Therapeutic Crystalline SPP -- an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP as described above, which is administered to a living organism in a composition or formulation or a pharmaceutical composition or formulation.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

41

Vaccine SPP or Vaccine Spherical

Nanocrystalline Composite Particle or Vaccine
Crystalline SPP -- an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, the protein component of which is an antigen derived from a pathogenic agent such as a virus, parasite, bacteria or tumor cell. The protein activity of such vaccine SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs is the induction of protective immune responses specific for a pathogenic agent or tumor.

Preparation of SPPs According to the Methods of This Invention

The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of this invention can be made by slow addition of protein crystallizing/precipitation agents to bring about a very gradual increase in the concentration of the precipitating agents. Dialysis may be used for effecting such a slow change. However, direct addition in a controlled manner is a method that may also yield SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. In dialysis, the macromolecule of interest (e.g., enzyme, antibody, hormone) is in low ionic-strength solution. The macromolecule solution is encased in a membrane casing or in a container having a semi-permeable membrane partition. During dialysis, the dialysis membrane selectively allows the passage of small molecules and ions, but pore size prevents passage of the larger macromolecules. The vessel or dialysis tube containing the protein is submerged in a larger volume of liquid that has the desired properties of pH, ionic strength, ligand concentration, etc. The protein solution gradually acquires the desired

WO 03/000014

PCT/US02/19870

42

properties and components. Dialysis is the preferred method of this invention.

Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 5 may be generated by direct addition of the precipitants/buffers in a controlled manner (See Example 6).

Production of SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs of Biologically Active Proteins, or Compositions or Formulations Comprising Them:

Dialysis Method:

Dialysis is a way of modifying the components and degree of saturation of a protein solution. The 15 macromolecule (e.g., enzyme, antibody or hormone) solution is enclosed in a membrane casing or in a container having a semipermeable membrane partition. The membrane selectively allows the passage of small molecules and ions, but pore size prevents passage of 20 the larger macromolecules. The vessel or dialysis tube containing the protein is submerged in a larger volume of liquid that has the desired properties of pH, ionic strength, ligand concentration, etc. The protein solution gradually acquires the desired properties and 25 components.

Dialysis Using a Slide-A-Lyzer:

A. This dialysis method employs a device called a Slide-A-Lyzer (Pierce Chemicals, Catalog # 69570). The 30 Slide-A-Lyzer used herein has a molecular weight cut-off point at 10 kD.

B. Procedure:

WO 03/000014

PCT/US02/19870

43

1. Take Slide-A-Lyzer units and soak in distilled water overnight.
2. Take another tube such as the lower part of a small Centricon device (Amicon, Catalog # 4208) and 5 fill with 3.8-3.9 ml of, e.g.,:
 - 2.05 M ammonium sulfate (calculated assuming saturated ammonium sulfate is a 4.1 M solution at room temperature), 0.1 M buffer (acetate, phosphate, Tris), and 1.5% propylene glycol.
- 10 Add the reagents in the following order: 1) water, 2) buffer, 3) propylene glycol, and 4) saturated Ammonium sulfate.
- 15 3. Place a 3.5 mm x 3.5 mm stirring bar in the lower part of the device. Ensure that it is stirring steadily (no clinging to the wall) in the middle.
4. Place 150-410 μ l of the desired protein solution, at a protein concentration approximately equal to 10-20 mg/ml, in the Slide-A-Lyzer. Immerse 20 the membrane such that it is a millimeter or two below the level of the buffer/propylene glycol/ammonium sulfate solution.
- 25 5. Put the cap on the Slide-A-Lyzer, tight enough to prevent evaporation. Dialyze for the appropriate time at the appropriate temperature.
- 30 6. After dialysis, check the results of the dialysis using HPLC and microscopy, and determine the protein content of the supernatant by measuring absorbance at an Optical Density of 280 nm. Check and harvest whenever appropriate, but not long after the layer of liquid disappeared above the sediment. This is crucial for the following reasons:
 - a) If the protein has aggregate in it, the aggregate tends to form spheres first, leaving the desired

WO 03/000014

PCT/US02/19870

44

protein as a monomer in the supernatant. At this juncture, the supernatant can be harvested and transferred to another membrane and let dialysis proceed until spheres form.

5 b) If the antibody has been spiked into clarified non-transgenic milk, the milk proteins tend to form spheres last and therefore it is crucial to stop the dialysis at the right time to achieve efficient fractionation of the desired protein.

10 Non-Dialysis Method:

A further method of producing SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs according to this invention does not involve dialysis. Instead, precipitating reagents, e.g. ammonium sulfate, 15 can be slowly added at increments, thereby increasing the concentration of the protein solution in a stepwise manner. The protein solution mixtures are allowed to equilibrate for one hour at each concentration. Samples are periodically analyzed by microscopy to 20 determine sphere formation. Protein content, yield, and the amount of protein remaining in the supernatant are measured by spectroscopy at optical density (OD) of 280 nm and HPLC.

Preparation of SPP, Spherical Nanocrystalline Composite
25 Particles and Crystalline SPP Compositions or
Formulations:

According to one embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active 30 proteins, or compositions or formulations comprising them, are prepared by the following process.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

45

First, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein of interest are generated. Next, excipients or ingredients selected from sugars, sugar alcohols, viscosity increasing agents, wetting or solubilizing agents, buffer salts, emulsifying agents, antimicrobial agents, antioxidants, and coating agents are added directly to the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP preparation. The excipient concentration is typically between about 0.01 to 30% W/W; most preferably between about 0.1 to 10%. The ingredient concentration is between about 0.01 to 90%. The SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP concentration is between about 0.01 to 99%.

The preparation buffer is then removed from the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP solution either by filtration or by centrifugation. Subsequently, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are washed, optionally with solutions of about 50 to about 100% of one or more organic solvents such as, for example, ethanol, methanol, isopropanol or ethyl acetate, either at room temperature or at temperatures between about -20 °C to about 25 °C.

The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are then dried either by passing a stream of nitrogen, air, or inert gas over the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. Alternatively, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are dried by air drying, spray drying, lyophilization or vacuum drying. The drying is carried out for a minimum of about 1 hour to a maximum of about

WO 03/00014

PCT/US02/19870

46

72 hours after washing, until the moisture content of the final product is below about 10% by weight, most preferably below about 5%. Finally, micronizing (reducing the size) of the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs can be performed if desired.

According to one embodiment of this invention, when preparing SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, enhancers, such as surfactants, are not added during preparation. Excipients or ingredients are added to the preparation buffer after the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs have been prepared, at a concentration of between about 1-10% W/W, alternatively at a concentration of between about 0.1-25% W/W, alternatively at a concentration of between about 0.1-50% W/W. The excipient or ingredient is incubated with the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in the preparation buffer for about 0.1-3 hrs, alternatively the incubation is carried out for 0.1-12 hrs, alternatively the incubation is carried out for 0.1-24 hrs.

In another embodiment of this invention, the ingredient or excipient is dissolved in a solution other than the preparation buffer, and the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are removed from the preparation buffer and suspended in the excipient or ingredient solution. The ingredient or excipient concentrations and the incubation times are the same as those described above.

According to another embodiment of this invention, the protein component of the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP is a protein other than one of the following:
5 α -L-iduronidase or lysozyme or albumin or insulin or human (rh) deoxribonuclease (DNase) or catalase.

According to another embodiment of this invention, the protein component of the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP
10 is a protein other than all of the following:
5 α -L-iduronidase, lysozyme, albumin, insulin, human (rh) deoxribonuclease (DNase) and catalase.

Uses For the SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles and Crystalline SPPs of This Invention
15 The present invention advantageously provides SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them. It is desirable to produce SPPs, spherical nanocrystalline
20 composite particles or crystalline SPPs that are pure and stable under storage conditions at ambient or extreme temperatures. Such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs constitute a particularly advantageous form for dosage
25 preparations of therapeutics and vaccines. The present invention also provides compositions or formulations for storage of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, as either solid particles or dispersed in a non-aqueous solvent.
30 Furthermore, the invention may be applied to the storage of a single biologically active protein or a mixture of proteins that may, or may not interact with each other.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

48

Also, solid SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP preparations can be easily reconstituted to generate ready to use parenteral compositions and formulations having very high protein concentrations. Such protein concentrations are considered to be particularly useful where the formulation is intended for subcutaneous administration. For subcutaneous administration, injection volumes of about 1.5 ml or less are well tolerated. Thus, for proteins that are dosed at about 1 mg/kg on a weekly basis a protein concentration of at least about 50 mg/ml is required and about 100-200 mg/ml is preferred. A most preferred embodiment is an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP composition or formulation having a protein concentration of up to about 400 mg/ml. These concentrations are difficult to achieve in liquid formulations, due to the aggregation problems. They can easily be achieved in the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP preparations, and compositions and formulations thereof, of this invention.

In another embodiment, this invention provides a method for generating SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of antibodies, including monoclonal antibodies, and also single-chain Fv (scFv) fragments of antibodies, and using such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in various biomedical applications. Such scFv fragments are constructed by linking the variable region of an antibody heavy chain to a variable region of an antibody light chain through the use of a linker peptide. Due to their small size, scFv fragments allow tissue penetration more readily than do

WO 03/000014

PCT/US02/19870

49

intact antibodies, and therefore may have valuable therapeutic applications for particular indications.

This invention includes the production of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of all of the immunoglobulin classes IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, and serum IgA (sIgA) as well as the subclasses IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, IgM1 and IgM2, and IgA1 and IgA2, as well as scFv fragments from all the immunoglobulin classes and subclasses.

In another embodiment, this invention provides a method for rendering biologically active SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs suitable for storage.

In yet another embodiment of this invention, an aqueous preparation of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs can be rendered solid by spinning out the first solvent and washing the remaining SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP solid using a second organic solvent to remove water, followed by evaporation of the non-aqueous solvent.

Non-aqueous preparations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins are especially useful for parenteral administration, including, e.g., subcutaneous delivery and intramuscular delivery, while solid compositions or formulations are ideally suited for pulmonary administration. As will be appreciated by those of skill in the art, pulmonary delivery is particularly useful for biological macromolecules which are difficult to deliver by other routes of administration.

In another embodiment, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs

WO 03/00014

PCT/US02/19870

50

of proteins, including intact antibodies, and SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of single chain antibody fragments according to this invention are useful in diagnostic methods and kits. For example, such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs may be used in a kit for diagnosing the presence a target antigen or antibody in a sample from a patient or another specimen. Such a kit may comprise a container and, optionally, instructions for use. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in the kit may be labelled with a detectable label. Methods for detecting a target antigen or antibody in a sample, such as a blood, tumor, cell, or tissue sample, may be carried out by mixing the sample with SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of proteins or intact antibodies or single chain antibody fragments according to this invention and determining whether the sample binds to the protein, antibody or fragment. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs used in such methods may be labelled with a detectable label.

Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of proteins, such as intact antibodies or single chain antibody fragments according to this invention, are useful in chromatography and purification methods, such as affinity chromatography. For example, affinity matrix purification of a protein may be carried out by:

- (a) mixing with a binding buffer SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of an intact antibody or SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs

WO 03/000014

PCT/US02/19870

51

- of a single chain Fv antibody fragment, wherein such antibody or antibody fragment has affinity for the protein to be purified;
- (b) adding a protein solution containing the protein to be purified to the crystal(buffer mixture;
- 5 (c) incubating the entire mixture for a time and at a temperature sufficient to permit binding of the protein to the antibody or antibody fragment;
- (d) washing the mixture with a wash buffer; and
- 10 (e) eluting the protein with an elution buffer.

Administration and Biological Delivery:

To date, therapeutic proteins, e.g., intact antibodies, have generally been administered by frequent injection or infusion, due to their characteristic negligible oral bioavailability and short plasma life. SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, as well as compositions or formulations comprising them (which include microparticulate-based sustained release systems for biologically active proteins), advantageously permit improved patient compliance and convenience, more stable blood levels and potential dose reduction. The slow and constant release capabilities afforded thereby advantageously permit reduced dosages, due to more efficient delivery of active protein. Significant cost savings may be achieved by using the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles, crystalline SPPs and compositions or formulations described herein.

30 The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and compositions or formulations of the present invention enhance preservation of the native biologically active

WO 03/00014

PCT/US02/19870

52

secondary or tertiary structure of the biologically active proteins. The biological activity and conformation of the protein component of the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or 5 crystalline SPP can be measured and compared with its native, soluble counterpart using a number of methods, including, *inter alia*:

1. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to measure secondary structure:

10 FTIR Spectroscopy is a useful method for measuring the secondary structural characteristics of the protein component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP and comparing it with that of its native, soluble 15 counterpart. More particularly, FTIR Spectroscopy can measure the α -helical or β -sheet content of a protein derived from an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP and compare it with the α -helical or β -sheet content of its native, 20 soluble counterpart. See Example 13.

2. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to measure tertiary structure:

FTIR Spectroscopy is also useful for measuring the tertiary structural characteristics of the protein 25 component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP and comparing it with that of its native, soluble counterpart. See Example 46.

3. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy:

30 CD Spectroscopy is a useful method for the rapid determination of a molecule's structural features. CD spectra allow characterization of the secondary structure of a protein, including, *inter alia*, the β -sheet content, the α -helical content, the β -turn

WO 03/000014

PCT/US02/19870

53

content and the random coil content of a protein being assayed. CD spectra further allow characterization of the type of structure of a nucleic acid including, *inter alia*, whether the nucleic acid molecule is A-form (A-DNA or A-RNA), B-form (B-DNA) or Z-form (Z-DNA). In this way, the secondary structure of proteins or nucleic acids derived from dissolving SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs or spherical nucleic acid particles, spherical nanocrystalline composite nucleic acid particles or crystalline spherical nucleic acid particles may be compared to their soluble counterparts. See Example 44.

4. ELISAs to measure specific binding of a monoclonal antibody to its antigen:

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays may be used to compare the antigenic conformation of a protein derived from an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or a crystalline SPP with that of its native, soluble counterpart, by using a monoclonal antibody which specifically binds the native, soluble counterpart. See Example 45.

5. Bioimmunoassays for the Determination of Biological Activity of Antibodies:

Alternatively, the biological activity of the protein component of antibody SPPs, antibody spherical nanocrystalline composite particles or antibody crystalline SPPs may be determined by bioimmunoassays. Bioimmunoassays are useful for measuring the biological activity of an antibody. Bioimmunoassays for measuring the biological activity of an antibody include, *inter alia*, direct cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), described below. These

WO 03/00014

PCT/US02/19870

54

assays are useful for comparing the residual biological activity of antibodies derived from antibody SPPs, antibody spherical nanocrystalline composite particles or antibody crystalline SPPs with that of their soluble 5 antibody counterparts. In this way, the effects of making SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs from antibodies, short- or long-term storage, drying, and forming and subsequently dissolving SPP, spherical nanocrystalline 10 composite particle and crystalline SPP compositions or formulations, may be determined and compared to the soluble counterpart of the antibody in question.

The cytotoxicity of an antibody on its antigen bearing target cells can be characterized by three 15 assays, e.g. direct cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The target cells for Rituxan are the cells that overexpress CD-20 antigen on their surface, which include Raji, Daudi, JOK1 and 20 WT100. The specific antigen for Herceptin is HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 protein), which is overexpressed in human breast adenocarcinoma cell lines including SK-BR-3, BT474, and MCF/HER2.

The SPPs, spherical nanocrystalline composite 25 particles or crystalline SPPs and compositions and formulations thereof of the present invention create a reservoir which can slowly release active protein to a subject where and when they are needed. The biologically active protein is subsequently released in 30 a controlled manner over a period of time, as determined by the particular encapsulation technique, polymer formulation, SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP size, SPP, spherical nanocrystalline composite particle or

WO 03/000014

PCT/US02/19870

55

crystalline SPP solubility, and the presence and nature of any excipients used. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and compositions and formulations thereof of this 5 invention may be reconstituted with a diluent for the parenteral administration of biologically active proteins.

One embodiment of a composition according to this invention is a formulation. Formulations 10 comprising SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins in polymeric delivery carriers according to this invention may also comprise any conventional carrier or adjuvant used in vaccines, pharmaceuticals, 15 personal care formulations or compositions, veterinary formulations or compositions, or oral enzyme supplementation. These carriers and adjuvants include, for example, Freund's adjuvant, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, buffer 20 substances, such as phosphates, glycine, sorbic acid, potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts or electrolytes, such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, 25 colloidal silica, magnesium, trisilicate, cellulose-based substances and polyethylene glycol. Adjuvants for topical or gel base forms may include, for example, sodium carboxymethylcellulose, polyacrylates, polyoxyethylene-polyoxypropylene-block polymers, 30 polyethylene glycol and wood wax alcohols.

According to one embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, including intact antibodies or single chain Fv antibody

WO 03/000014

PCT/US02/19870

56

fragments, may be combined with any conventional materials used for controlled release administration, including pharmaceutical controlled release administration and carrier-free pharmaceutical controlled release administration. Such materials include, for example, coatings, shells and films, such as enteric coatings and polymer coatings and films.

Compositions, including formulations, comprising SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, may be delivered to humans, animals, or plants at the desired site of delivery according to this invention. Such delivery may include parenteral administration, including, e.g., subcutaneous, intravenous, or intramuscular injection, or the use of devices, such as implant-capable devices, or may involve other delivery systems, e.g., oral, pulmonary inhalation, transdermal, needleless injection and needleless sub-cutaneous administration.

In one embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 300 μm . In another embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 200 μm . In another embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 100 μm . In another embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 10 μm . In a most

WO 03/00014

PCT/US02/19870

57

preferred embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 5 μm . In another 5 embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 1 μm . In another embodiment of this invention, SPPs, spherical 10 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 999 nm. In another embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 15 of a biologically active protein have a diameter between about 0.04 μm and about 499 nm.

In a preferred embodiment of the spherical nanocrystalline composite particles according to this invention, the particles are from about 1 μm to about 20 300 μm in diameter, and comprise protein nanocrystals having a diameter between about 40 nm and about 999 nm. A most preferred embodiment of the spherical nanocrystalline composite particles according to this 25 invention is that the spherical nanocrystalline composite particles are from about 1 μm to about 300 μm in diameter, and comprise protein nanocrystals having a diameter between about 40 nm and about 499 nm.

In one embodiment of this invention compositions, including formulations, comprising SPPs, 30 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs have a protein concentration in solution greater than about 1 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present invention have protein concentration in solution

WO 03/00014

PCT/US02/19870

58

greater than about 10 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present invention have a protein concentration in solution greater than about 20 mg/ml. Alternatively, 5 compositions, including formulations, of the present invention have a protein concentration in solution greater than about 50 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present invention have a protein concentration in solution 10 greater than about 100 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present invention have a protein concentration in solution greater than about 120 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present 15 invention have a protein concentration in solution greater than about 200 mg/ml. Alternatively, compositions, including formulations, of the present invention have a protein concentration in solution greater than about 400 mg/ml.

20 According to this invention, any individual, including humans, animals and plants, may be treated in a pharmaceutically acceptable manner with a pharmaceutically effective amount of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 25 of a biologically active protein, or compositions or formulations comprising such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, for a period of time sufficient to treat a condition in the individual to whom they are 30 administered over some period of time. Alternatively, individuals may receive a prophylactically effective amount of biologically active SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising such

WO 03/000014

PCT/US02/19870

59

SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs which is effective to prevent a condition in the individual to whom they are administered over some period of time.

5 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, may be administered alone, as part of a pharmaceutical, personal care or veterinary preparation, or as part of a prophylactic preparation, with or without adjuvant. They may be administered by parenteral or oral routes. For example, they may be administered by oral, pulmonary, nasal, aural, anal, dermal and transdermal, ocular, intravenuous, 10 intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, mucosal, sublingual, subcutaneous, transdermally, or intracranial route. In either pharmaceutical, personal care or veterinary applications, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline 15 SPPs, or compositions or formulations thereof, may be topically administered to any epithelial surface. Such epithelial surfaces include oral, ocular, aural, anal and nasal surfaces, which may be treated, protected, repaired or detoxified by application of SPPs, 20 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations thereof.

Pharmaceutical, veterinary or prophylactic compositions or formulations comprising SPPs, spherical 25 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins or compositions or formulations comprising them may also be selected from the group consisting of tablets, liposomes, granules,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

60

spheres, microparticles, microspheres, aerosols and capsules.

For such uses, as well as other uses according to this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, may be formulated into tablets. Such tablets constitute a liquid-free, dust-free form for storage of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, which are easily handled and retain acceptable levels of activity or potency.

Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, may be in a variety of conventional forms employed for administration to provide reactive compositions or formulations. These include, for example, solid, semi-solid and liquid dosage forms, such as liquid solutions or suspensions, slurries, gels, creams, balms, emulsions, lotions, powders, sprays, foams, pastes, ointments, salves, balms and drops.

SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, may also comprise any conventional carrier or adjuvant used in pharmaceuticals, personal care compositions or formulations or veterinary compositions or formulations. These carriers and adjuvants include, for example, Freund's adjuvant, ion exchangers, alumina, aluminum stearate, lecithin, buffer substances, such as phosphates, glycine, sorbic acid,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

61

potassium sorbate, partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, water, salts or electrolytes, such as protamine sulfate, disodium hydrogen phosphate, sodium chloride, zinc salts, 5 colloidal silica, magnesium, trisilicate, cellulose-based substances and polyethylene glycol. Adjuvants for topical or gel base forms may include, for example, sodium carboxymethylcellulose, polyacrylates, polyoxyethylene-polyoxypropylene-block polymers, 10 polyethylene glycol and wood wax alcohols.

The most effective mode of administration and dosage regimen of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations 15 comprising them, will depend on the effect desired, the outcome of SPP, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPP administration, previous therapy, if any, the individual's health status or status of the condition itself and response to the 20 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins or compositions or formulations comprising them and the judgment of the treating physician or clinician. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or 25 crystalline SPPs or compositions or formulations comprising them may be administered in any dosage form acceptable for pharmaceuticals, immunotherapy, or veterinary compositions or formulations, at one time or over a series of treatments.

30 The amount of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, which provides a single dosage will vary depending upon the particular mode of

WO 03/00014

PCT/US02/19870

62

- administration, the particular type of SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP or composition or formulation thereof, and the dose level or dose frequency. A typical preparation will 5 contain between about 0.01% and about 99%, preferably between about 1% and about 50%, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins (w/w). Alternatively, a preparation will contain between about 0.01% and 10 about 80% SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, preferably between about 1% and about 50%, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins (w/w).
- 15 Upon improvement of the individual's condition, a maintenance dose of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulation comprising them, may be administered, if necessary.
- 20 Subsequently, the dosage or frequency of administration, or both, may be reduced as a function of the symptoms, to a level at which the improved condition is retained. When the condition has been alleviated to the desired level, treatment should 25 cease. Individuals may, however, require intermittent treatment on a long-term basis upon any recurrence of the condition or symptoms thereof.

The present invention may also utilize other slow release methodologies, such as silicon based rings 30 or rods which have been preloaded with SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs or compositions or formulations comprising them, and which can therefore act as implants for delivery. The purpose of this technique is to provide a constant

WO 03/00014

PCT/US02/19870

63

level of protein to the bloodstream over a period of weeks or months. Such implants can be inserted intradermally and can be safely removed and replaced when needed.

5 Other compositions or formulations according to this invention include vaccine compositions or formulations comprising SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of antigenic proteins, adjuvant, and, optionally, encapsulating
10 polymer(s). In one embodiment of this invention, an intact anti-idiotypic antibody is itself the immunogen, and thus the goal is that the intact antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations
15 comprising them, would elicit a response to the antigen that the anti-idiotype mimics or is closely related to. Therefore, the anti-idiotypic antibody can act as a type of vaccine or therapy against cancers and autoimmune diseases, e.g., allergies, as well as
20 viruses like hepatitis B virus.

One embodiment of such compositions or formulations involves a single vaccine injection containing microspheres having three or more different release profiles. In this way, SPPs, spherical
25 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of protein antigens, or anti-idiotypic antibodies that act like antigens, may be released over a sustained period sufficient to generate lasting immunity. By virtue of this composition or formulation, multiple
30 antigen boosts may be possible in single unit form. One advantage of such a system is that by using SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of antigenic proteins, or anti-idiotypic antibodies that act like antigens, the native

WO 03/000014

PCT/US02/19870

64

three-dimensional structures of the antigens are maintained and presented to the immune system in their native form.

Once the immune system is primed, there may be less need for an adjuvant effect. Therefore, in the slower degrading inoculations, a less immunogenic adjuvant may be included and possibly no adjuvant may be required in the slowest degrading microspheres of compositions or formulations. In this way, patient populations in remote areas need not have to be treated multiple times in order to provide protection against infectious diseases. One of skill in the art of biological delivery of protein antigens, or anti-idiotypic antibodies that act like antigens, will appreciate that many variations on this theme are feasible.

Another advantage of the present invention is that SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins, or compositions or formulations comprising them, can be dried by lyophilization (see Example 26, Method 3). Lyophilization, or freeze-drying allows water to be separated from the composition or formulation. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising them, are first frozen and then placed in a high vacuum. In a vacuum, the crystalline H₂O sublimes, leaving behind the intact SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or composition or formulation thereof, containing only the tightly bound water. Such processing further stabilizes the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or composition or formulation thereof, and allows for

WO 03/00014

PCT/US02/19870

65

easier storage and transportation at typically encountered ambient temperatures.

The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of this invention may 5 also be spray-dried (see Example 26, Method 6). Spray drying allows water to be separated from the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or composition or formulation thereof. It is highly suited for the continuous production of 10 dry solids in either powder, granulate or agglomerate form from liquid feedstocks as solutions, emulsions, and pumpable suspensions. Spray drying involves the atomization of a liquid feedstock into a spray of droplets and contacting the droplets with hot air in a 15 drying chamber. The sprays are produced by either rotary (wheel) or by nozzle atomizers. Evaporation of moisture from the droplets and formation of dry particles proceed under controlled temperature and airflow conditions. Relatively high temperatures are 20 needed for spray drying operations. However, heat damage to products is generally only slight, because of an evaporative cooling effect during the critical drying period and because the subsequent time of exposure to high temperatures of the dry material may 25 be very short. Powder is discharged continuously from the drying chamber. Operating conditions and dryer design are selected according to the drying characteristics of the product and the powder specification. Spray drying is an ideal process where 30 the end product must comply with precise quality standards regarding particle size distribution, residual moisture content, bulk density and particle shape.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

66

This feature is especially desirable for therapeutic proteins and protein vaccines, including anti-idiotypic antibodies, which can be dispensed into single dose sterile containers ("ampules") or alternatively, any desired increment of a single dose as a slurry, in a composition or formulation. The ampules containing the dispensed slurries or compositions or formulations can then be capped, batch frozen and lyophilized under sterile conditions. Such sterile containers can be transported throughout the world and stored at ambient temperatures. Such a system is useful for providing sterile vaccines and therapeutic proteins to remote and undeveloped parts of the world. At the point of use, the ampule is rehydrated with the sterile solvent or buffer of choice and dispensed. For such preparations, minimal or no refrigeration is required.

The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of this invention may also be nitrogen-dried (see Example 26, Method 1), air-dried (see Example 26, Method 5), air-dried after addition of organic solvents (see Example 26, Method 4), or vacuum oven-dried (see Example 26, Method 2).

In another embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins according to this invention may be crosslinked for additional stability. This allows for the use of such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising them, in areas of pH extremes, such as the gastrointestinal tract of humans and animals. For example, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active

proteins or vaccines, e.g., monoclonal antibody or anti-idiotypic antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, may be crosslinked using one of a variety of crosslinkers, 5 including, but not limited to, Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate.HCl (DTBP), Dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP), Bis maleimido- hexane (BMH), Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate (BS), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB),
10 Dimethylsuberimidate.2HCl (DMS), Disuccinimidyl glutarate (DSG), Disulfosuccinimidyl tartarate (Sulfo-DST), 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), Ethylene glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate] (Sulfo-EGS), N-
15 [g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS), N-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB), Sulfosuccinimidyl-6-[a-methyl-a-(2-pyridyldithio)toluamido] hexanoate (Sulfo-LC-SMPT), Bis-[b-(4-azidosalicylamido) ethyl]disulfide (BASED)
20 and glutaraldehyde (GA).

In a further embodiment of this invention, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of a protein, such as an intact antibody or scFv fragment of an antibody, may be 25 radiolabelled to be used in antibody radiation therapies. In such a therapy, for example, an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP containing a radiolabelled anti-cancer antibody or scFv fragment, or a composition or
30 formulations comprising them, can be delivered according to this invention, to the site of the cancer. After delivery, the released antibody or scFv fragment binds to its targeted cancer antigen and delivers the radioisotope directly to the cancerous cells or tumor.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

68

The release of the antibody may be timed according to this invention. Theoretically, useful radiolabels include, but are not limited to, the following radioisotopes or radionucleotides: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I . Practically, however, *in vivo* use in radiotherapies would limit the radiolabel to ^{131}I , ^{90}Y , or any other radiolabels defined by a short half-life. For example, the monoclonal antibody Rituximab has been labelled with $^{90}\text{Yttrium}$ (^{90}Y), in order to be used for radioimmunotherapy in patients with non-Hodgkin's lymphomas. This compound is commercially available as Zevalin[™] (IDEC Pharmaceuticals, (San Diego, CA)).

Encapsulation of SPPs, Spherical Nanocrystalline
15 Composite Particles or Crystalline SPPs of Biologically
Active Proteins in Polymeric Carriers:

According to one embodiment of this invention, formulations are produced when SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 20 of biologically active proteins are encapsulated in at least one polymeric carrier to form microspheres by virtue of encapsulation within the matrix of the polymeric carrier to preserve their native and biologically active tertiary structure. The SPPs, 25 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs can be encapsulated using various biocompatible and/or biodegradable polymers having unique properties which are suitable for delivery to different biological environments or for effecting 30 specific functions. The rate of dissolution and, therefore, delivery of active protein, is determined by the particular encapsulation technique, polymer

WO 03/000014

PCT/US02/19870

69

composition, polymer crosslinking, polymer thickness, polymer solubility, and antibody crystal geometry.

SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins to be encapsulated are suspended in a polymeric carrier which is dissolved in an organic solvent. The polymer solution must be concentrated enough to completely coat the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs after they are added to the solution. Such an amount is one which provides a weight ratio of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs to polymer between about 0.02 and about 20, preferably between about 0.1 and about 2. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are contacted with polymer in solution for a period of time between about 0.5 minutes and about 30 minutes, preferably between about 1 minutes and about 3 minutes. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs should be kept suspended and not allowed to aggregate as they are coated by contact with the polymer.

Following that contact, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs become coated and are referred to as nascent microspheres. The nascent microspheres increase in size while coating occurs. In a preferred embodiment of the invention, the suspended coated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs or nascent microspheres, along with the polymeric carrier and organic solvent, are transferred to a larger volume of an aqueous solution containing a surface active agent, known as an emulsifier. In the aqueous solution, the suspended nascent microspheres

WO 03/000014

PCT/US02/19870

70

are immersed in the aqueous phase, where the organic solvent evaporates or diffuses away from the polymer. Eventually, a point is reached where the polymer is no longer soluble and forms a precipitated phase

5 encapsulating the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs to form a formulation. This aspect of the process is referred to as hardening of the polymeric carrier or polymer. The emulsifier helps to reduce the interfacial surface

10 tension between the various phases of matter in the system during the hardening phase of the process.

Alternatively, if the coating polymer has some inherent surface activity, there may be no need for addition of a separate surface active agent.

15 Emulsifiers useful to prepare encapsulated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins according to this invention include poly(vinyl alcohol) as exemplified herein, surfactants and other surface

20 active agents which can reduce the surface tension between the polymer coated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and the solution.

In a preferred embodiment of this invention,

25 crystallinity of the spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs is maintained during the encapsulation process. The crystallinity is maintained during the coating process by using an organic solvent in which the spherical nanocrystalline

30 composite particles or crystalline SPPs are not soluble. Subsequently, once the coated spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are transferred to the aqueous solvent, rapid hardening of the polymeric carrier and sufficient coating of the

WO 03/000014

PCT/US02/19870

71

spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in the previous step shields the crystalline material from dissolution.

The polymers used as polymeric carriers to coat the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs can be either homo-polymers or co-polymers. The rate of hydrolysis of the microspheres is largely determined by the hydrolysis rate of the individual polymer species. In general, the rate of hydrolysis decreases as follows: polycarbonates > polyesters > polyurethanes > polyorthoesters > polyamides. For a review of biodegradable and biocompatible polymers, see W.R. Gombotz and D.K. Pettit, "Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery", Bioconjugate Chemistry, vol. 6, pp. 332-351 (1995).

In a preferred embodiment of this invention, the polymeric carrier comprises a single polymer type such as PLGA. In a next preferred embodiment, the polymeric carrier can be a mixture of polymers, such as 50% PLGA and 50% albumin.

Other polymers useful as polymeric carriers to prepare encapsulated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins according to this invention include biocompatible/biodegradable polymers selected from the group consisting of poly (acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly (esters), such as poly (lactic acid) or PLA, poly (β -hydroxybutyrate), poly (caprolactone) and poly (dioxanone); poly (ethylene glycol), poly (hydroxypropyl)methacrylamide, poly [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic

WO 03/000014

PCT/US02/19870

72

anhydride-alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols, albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives, starch and its derivatives, collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid, oligosaccharides, 5 glycaminoglycans, sulfated polysaccharides, blends and copolymers thereof. Other useful polymers are described in J. Heller and R.W. Balar, "Theory and Practice of Controlled Drug Delivery from Biodegradable Polymers," Academic Press, New York, NY, (1980); K.O.R. 10 Lehmann, H.M. Bossler and D.K. Dreher, Biol. Macromol. Monog. vol. 5, pp. 111-19 (1979); E.M. Ramadan, A. El-Helw and Y. El-Said, Journal of Microencapsulation, vol. 5, p. 125 (1988). The preferred polymer will depend upon the particular 15 protein component of the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs used and the intended use of the encapsulated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. Alternatively, the solvent 20 evaporation technique may be used for encapsulating SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (see D. Babay, A. Hoffmann and S. Benita, Biomaterials vol. 9, pp. 482-488 (1988). In a preferred embodiment of this invention, . 25 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins are encapsulated in at least one polymeric carrier using a double emulsion method, as illustrated herein, using a polymer, such as polylactic-co-glycolic acid. In a 30 most preferred embodiment of this invention, the polymer is Polylactic-co-glycolic acid ("PLGA"). PLGA is a co-polymer prepared by polycondensation reactions with lactic acid ("L") and glycolic acid ("G"). Various ratios of L and G can be used to modulate the

WO 03/000014

PCT/US02/19870

73

crystallinity and hydrophobicity of the PLGA polymer. Higher crystallinity of the polymer results in slower dissolution. PLGA polymers with 20-70% G content tend to be amorphous solids, while high levels of either G or L result in good polymer crystallinity. See D.K. Gilding and A.M. Reed, "Biodegradable polymers for use in surgery-poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 1., *Polymer* vol. 20, pp. 1459-1464 (1981). PLGA degrades after exposure to water by hydrolysis of the ester bond linkage to yield non-toxic monomers of lactic acid and glycolic acid.

Another embodiment of this invention includes double-walled polymer coated microspheres. Double-walled polymer coated microspheres may be produced by preparing two separate polymer solutions in methylene chloride or other solvent which can dissolve the polymers. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins are added to one of the solutions and dispersed. Here, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs become coated with the first polymer. Then, the solution containing the first polymer coated SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs is combined with the second polymer solution. [See Pekarek, K.J.; Jacob, J.S. and Mathiowitz, E. Double-walled polymer microspheres for controlled drug release, *Nature*, 367, 258-260 (January 20, 1994)]. As a result, the second polymer encapsulates the first polymer which is encapsulating the crystal. Ideally, this solution is then dripped into a larger volume of an aqueous solution containing a surface active agent or emulsifier. In the aqueous solution, the solvent

WO 03/00014

PCT/US02/19870

74

evaporates from the two polymer solutions and the polymers are precipitated.

Compositions according to this invention comprise SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins and at least one ingredient. Formulations according to this invention are compositions wherein at least one of the ingredients added to an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP 10 is a polymer.

SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins according to this invention may be characterized for secondary structure. More 15 particularly, such SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins may be characterized by β -sheet or α -helical structural content, as indicated by a correlation spectra as compared to the spectra of the 20 soluble protein counterpart determined by Fourier transform infrared (FTIR) spectra that is between about 0.8 and 1.0. A correlation coefficient of less than about 0.8 indicates an protein sample that has become denatured to such an extent that its secondary 25 structural content has changed, relative to the native, biologically active protein, by more than about 20%. This may result in protein aggregation and precipitation, or merely a loss of biological activity.

A correlation coefficient that is between 30 about 0.8 and 1.0 indicates that the protein sample has a secondary structural content that is about 80% to about 100% identical with that of its native, soluble counterpart.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

75

- SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions or formulations comprising them, may be characterized by the loss of less than 20% α -helical structural content of the protein after storage for from about 4 days to about 180 days at from about 4 °C to about 50 °C, wherein the soluble form of said protein loses more than 50% of its α -helical structural content after storage for 6 hours at 50 °C, as measured by FTIR.
- Alternatively, they are characterized by the loss of less than 20% α -helical structural content of the protein after storage for 4 days at 50 °C, wherein the soluble form of said protein loses more than 50% of its α -helical structural content after storage for 6 hours at 50 °C, as measured by FTIR.
- Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, and compositions or formulations comprising them, may be characterized by at least a 120-fold greater shelf life when stored at 50 °C than the soluble form of said protein in solution at 50 °C, as measured by $T_{1/2}$. SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, and compositions or formulations comprising them, may alternatively be characterized by at least a 60-fold greater shelf life when stored at 50 °C than the soluble form of said protein in solution at 50 °C, as measured by $T_{1/2}$.
- Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, and compositions or formulations comprising them, may be characterized by at least a 30-fold greater shelf life when stored at 50 °C than the soluble form of said protein in solution at 50 °C, as measured by $T_{1/2}$.
- SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and

WO 03/00014

PCT/US02/19870

76

crystalline SPPs, and compositions or formulations comprising them, may alternatively be characterized by at least a 10-fold greater shelf life when stored at 50 °C than the soluble form of said protein in solution at 5 50 °C, as measured by $T_{1/2}$. Alternatively, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles and crystalline SPPs, and compositions or formulations comprising them, may be characterized by a greater shelf life when stored at 50 °C than the soluble form 10 of said protein in solution at 50 °C, as measured by $T_{1/2}$.

Alternatively, the biological activity of SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody may be 15 determined by bioimmunoassays. Bioimmunoassays for measuring the biological activity of an antibody include, *inter alia*, direct cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), described below. 20 These assays are useful for comparing the residual biological activity of antibodies derived from antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline antibody SPPs with their soluble antibody counterparts. In this way, the effects of making SPPs, 25 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs from antibodies, short- or long-term storage, drying, and forming and subsequently dissolving SPP, spherical nanocrystalline composite particle and crystalline SPP compositions or 30 formulations, may be determined and compared to the soluble counterpart of the antibody in question.

The cytotoxicity of an antibody on its antigen bearing target cells can be characterized by three assays, e.g. direct cytotoxicity, complement

WO 03/00014

PCT/US02/19870

77

dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The target cells for Rituxan are the cells that overexpress CD-20 antigen on their surface, which include Raji, Daudi, JOK1 and WT100. The specific antigen for Herceptin is HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 protein), which is overexpressed in human breast adenocarcinoma cell lines including SK-BR-3, BT474, and MCF/HER2.

- 10 Preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 50% of the biological activity of its soluble antibody counterpart. More preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 60% of the biological activity of its soluble antibody counterpart. More preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 70% of the biological activity of its soluble antibody counterpart. More preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 80% of the biological activity of its soluble antibody counterpart. More preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 90% of the biological activity of its soluble antibody

WO 03/000014

PCT/US02/19870

78

counterpart. Most preferably, the protein antibody component derived from dissolving SPPs, crystalline SPPs or spherical nanocrystalline composite particles comprising an antibody, will have about 100% of the 5 biological activity of its soluble antibody counterpart.

Spherical Nucleic Acid Particles

In another embodiment of this invention, the methods disclosed herein are useful for forming 10 spherical particles of nucleic acids, i.e., spherical nucleic acid particles ("SNAPs"). SNAPs may be useful as vaccine antigens for the development of DNA vaccines. SNAPs may also be useful for the delivery of genes in gene therapy strategies.

15 Stability of Encapsulated SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs of Biologically Active Proteins

Those of skill in the art will appreciate that protein stability is one of the most important 20 obstacles to successful formulation of polymer microparticulate delivery systems that control the release of proteins. Protein stability of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of biologically active proteins 25 encapsulated in polymeric carriers may be challenged at three separate stages: manufacture of the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP compositions or formulations, protein release from the resulting SPP, spherical 30 nanocrystalline composite particle or crystalline SPP compositions or formulations, and in vivo stability after the protein release. During preparation of

WO 03/000014

PCT/US02/19870

79

microparticles or microspheres containing soluble or amorphous proteins, the use of organic solvents and lyophilization are especially detrimental to protein stability. Subsequently, released proteins are 5 susceptible to moisture-induced aggregation, thus resulting in permanent inactivation.

In order to achieve high protein stability during preparation of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPP compositions or 10 formulations according to the present invention, it is necessary to restrict the mobility of individual biologically active protein molecules -- a result achievable through the use of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline 15 SPPs.

Maintaining the Morphology, Crystallinity and Stability of SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs when Making Formulations:

20 In order to use SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs as the protein source for preparing protein formulations according to the present invention, the problem of SPP, spherical nanocrystalline composite 25 particle or crystalline SPP dissolution outside the mother liquor used during the dialysis procedure had to be overcome. In order to maintain the morphology and/or crystallinity and/or stability of the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or 30 crystalline SPPs used in the production of formulations, several approaches may be used:
1. Many compounds used in SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP production according to this invention are

WO 03/000014

PCT/US02/19870

80

compatible with polymer processing conditions, and may therefore be included when making formulations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. These include,
5 *inter alia*, salts, organic solvents, metals and PEG.
2. Dried SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs: The preparative buffer(s) (i.e., mother liquor) can be removed by
10 filtration and the remaining "paste" can be dried by air, under vacuum, by washing with water-miscible organic solvents and/or by lyophilization or spray drying.
3. The SPP, spherical nanocrystalline composite
15 particle or crystalline SPP size can be manipulated and controlled in the course of preparing formulations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs. Thus, a range of sizes are available, each
20 conferring different dissolution kinetics and subsequently different sustained release profiles when the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP formulations are used to deliver proteins to a subject.

25

Removal of Antibody Aggregates During Formation of Antibody SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Antibody Particles or Crystalline Antibody SPPs:

Aggregation is a serious problem often encountered with antibody preparations and can cause adverse effects in patients who receive such antibody preparations. In another embodiment of this invention, the process of formation of antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or

WO 03/000014

PCT/US02/19870

81

crystalline antibody SPPs removes antibody aggregates that may form during antibody preparation. (see Example 13).

EXAMPLES

5 In order that this invention may be better understood, the following examples are set forth. These examples are for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the scope of the invention in any manner.

10 Example 1 Preparation of Spherical Protein Particles of Infliximab

Infliximab is a chimeric murine/human monoclonal antibody commercially available as Remicade™ (Centocor, Leiden, the Netherlands). This monoclonal antibody has been widely used to treat rheumatoid arthritis and Crohn's disease. Infliximab is a chimeric IgG1 kappa immunoglobulin that binds to the TNF_α antigen. It is composed of murine light- and heavy-chain variable region sequences and a human constant region sequence. The Infliximab antibody has an approximate molecular weight (Mwt) of 149 kD.

Infliximab SPP Preparation

Materials:

25 Infliximab antibody (each vial contains 100 mg Infliximab, 500 mg sucrose, 0.5 mg polysorbate 80, 2.2 mg monobasic sodium phosphate and 6.1 mg dibasic sodium phosphate) reconstituted in 10 ml water, pH approximately 7.2 (concentration equal to 10 mg/ml).

Procedure:

WO 03/00014

PCT/US02/19870

82

Infliximab SPPs were formed using a Slide-A-Lyzer (Pierce Chemicals, Catalog # 69570), which was used as follows:

Dialysis Using a Slide-A-Lyzer:

5 A. The Slide-A-Lyzer used herein had a molecular weight cut-off point at 10 kD.

B. Procedure:

1. Slide-A-Lyzer membrane units were soaked in distilled water overnight.
- 10 2. The lower part of a small Centricon tube (Amicon, Catalog # 4208) was filled with 3.8-3.9 ml of an appropriate buffer (for Infliximab, see below).
- 15 3. A 3.5 mm x 3.5 mm magnetic stirring bar was used to stir the solution in the lower part of the Centricon device.
- 20 4. 150-410 µl of the desired protein solution (for this example, Infliximab), at a protein concentration approximately equal to 10-20 mg/ml, was added to the Slide-A-Lyzer apparatus. The appropriate membrane unit was placed in the Slide-A-Lyzer apparatus such that it was a millimeter or two below the level of the buffer solution, and the cap was placed on the Slide-A-Lyzer unit, tight enough so as to prevent evaporation.
- 25 5. The buffer/protein mixture was then dialyzed for the appropriate time at the appropriate temperature.
- 30 6. After dialysis, the presence or absence of SPPs was determined using HPLC and microscopy, the protein content of the supernatant was determined by measuring absorbance at an Optical Density of 280 nm (OD_{280}). SPPs were harvested at the appropriate time.

Formation of Infliximab SPPs:

150 µl of a 10 mg/ml solution of Infliximab was dialyzed against 3.9 ml of a solution consisting of

WO 03/000014

PCT/US02/19870

83

2.1 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate, pH 5.8, 1% propylene glycol. A 10,000 MW cut-off dialysis membrane (in a Slide-A-Lyzer) was used. The mixture was dialyzed at room temperature for 28 hours. Then 5 the protein solution was washed twice in 800 μ l of a solution consisting of 2.42 M ammonium sulfate, 1% propylene glycol, 0.1 M sodium acetate pH 5.8, centrifuged, and resuspended in approximately 200 μ l of the same solution.

10 Results:

Infliximab SPPs formed after 28 hours. See Figure 1A.

Example 2 Preparation of Spherical Protein Particles of Rituximab

15 Rituximab is a chimeric murine/human monoclonal antibody commercially available as Rituxan[™] (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). This monoclonal antibody has been widely used to treat non-Hodgkins lymphoma. Rituximab is a chimeric IgG1 kappa 20 immunoglobulin that binds to the CD20 antigen on the surface of normal and malignant B-lymphocytes. It is composed of murine light- and heavy-chain variable region sequences and a human constant region sequence. The Rituximab antibody has an approximate molecular 25 weight (Mwt) of 145 kD.

Rituximab SPP Preparation

Materials:

Rituximab antibody (stored until use at 4°C, at 10 mg/ml in 9.0 mg/ml sodium chloride, 7.35 mg/ml 30 sodium citrate anhydrate, 0.7 mg/ml Polysorbate 80 and sterile water, pH 6.5)

Procedure:

WO 03/000014

PCT/US02/19870

84

Rituximab SPPs were formed using a 10,000 MW cut-off Slide-A-Lyzer, according to the method described above for Infliximab (Example 1).
100 µl of a 5-10 mg/ml solution of Rituximab
5 was dialyzed against 3.9 ml of a solution consisting of 2.1 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate pH 5.8, 1% propylene glycol. A 10,000 MW cut-off dialysis membrane was used. The mixture was dialyzed at room temperature for 28 hours. Then the protein solution
10 was washed twice in 800 µl of a solution consisting of 2.42 M ammonium sulfate, 1% propylene glycol, 0.1 M sodium acetate, pH 5.8, centrifuged, and resuspended in approximately 200 µl of the same solution.

Results:

15 Rituximab SPPs formed after 28 hours. See Figure 1B.

Example 3 Preparation of Spherical Protein Particles of Trastuzumab

Trastuzumab is a monoclonal antibody
20 commercially available as Herceptin™ (Genentech, Inc., South San Francisco, CA).

Trastuzumab SPP Preparation

Materials:

25 Trastuzumab antibody (available as a lyophilized powder containing 22 mg Trastuzumab, 1 mg L-histidine HCl, 0.64 mg L-Histidine, 40 mg trehalose dihydrate, 0.18 mg polysorbate 20), reconstituted in 1 ml water (22 mg/ml), pH 6.

Procedure:

30 Trastuzumab SPPs were formed using a 10,000 MW cut-off Slide-A-Lyzer, according to the method described above for Example 1.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

85

100 μ l of a Trastuzumab solution (at 22 mg/ml Trastuzumab) was dialyzed against 3.9 ml of a solution consisting of 2.1 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate pH 5.8, 1% propylene glycol. A 10,000 MW cut-off dialysis membrane was used. The mixture was 5 dialyzed at room temperature for 28 hours. Then the protein solution was washed twice in 800 μ l of a solution consisting of 2.42 M ammonium sulfate, 1% propylene glycol, 0.1 M sodium acetate, pH 5.8, 10 centrifuged, and resuspended in approximately 200 μ l of the same solution.

Results:

Trastuzumab SPPs formed after 28 hours. See Figure 1C.

15 Example 4 Preparation of Spherical Protein Particles of Etanercept

Etanercept is a commercially available monoclonal antibody available as Enbrel™ (Immunex, Seattle, WA).

20 Etanercept SPP Preparation

Materials:

Etanercept antibody (in a solution containing 40 mg mannitol, 10 mg sucrose and 1.2 mg tromethamine).

Procedure:

25 Entanercept SPPs were formed using a 10,000 MW cut-off Slide-A-Lyzer, according to the method described above for Example 1. A 200 μ l aliquot of a 25 mg/ml Etanercept solution (containing 40 mg mannitol, 10 mg sucrose and 1.2 mg tromethamine) was 30 dialyzed against 3.9 ml of a solution consisting of 2.31 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium acetate, pH 5.8, 1% propylene glycol. A 10,000 MW cut-off dialysis

WO 03/000014

PCT/US02/19870

86

membrane was used. The mixture was dialyzed at 4°C for 28 hours. Then the protein solution was washed twice in 800 µl of a solution consisting of 2.62 M ammonium sulfate, 1% propylene glycol, 0.1 M sodium acetate, pH 5.8, centrifuged, and resuspended in approximately 200 µl of the same solution.

Results:

Etanercept SPPs formed after 28 hours.

Example 5 Preparation # 2 of Spherical Protein Particles of Etanercept

Etanercept SPP Preparation, Method 2

Materials:

Etanercept SPPs were formed using a 10,000 MW cut-off Slide-A-Lyzer, according to the method described above for Example 1. Etanercept antibody (in a solution containing 40 mg mannitol, 10 mg sucrose and 1.2 mg tromethamine).

Procedure:

25 µl of a 25 mg/ml Etanercept solution was dialyzed against 3.9 ml of a solution consisting of 6 M sodium formate, pH 7.5. A 10,000 MW cut-off dialysis membrane was used. The mixture was dialyzed at 4°C for 28 hours. Then the protein solution was washed twice in 800 µl of a solution consisting of 6.5 M ammonium sulfate, centrifuged, and resuspended in approximately 100 µl of the same solution.

Results:

Etanercept SPPs formed after 28 hours.

Example 6 Preparation # 2 of Spherical Protein Particles of Rituximab: Non-Dialysis Method

WO 03/000014

PCT/US02/19870

87

Rituximab SPP Preparation

Materials:

Rituximab antibody (stored until use at 4°C,
at 10 mg/ml in 9.0 mg/ml sodium chloride, 7.35 mg/ml
5 sodium citrate anhydrate, 0.7 mg/ml Polysorbate 80 and
sterile water, pH 6.5)

Procedure:

Aliquots of 4 M ammonium sulfate were added
to 200 µl of a 10 mg/ml Rituximab solution, slowly
10 increasing concentration stepwise by 0.2 M, starting
with 0.5 M and increasing to 2.2 M. The mixtures were
allowed to equilibrate for one hour at each
concentration. Samples were periodically analyzed by
microscopy to determine sphere formation. Protein
15 content, yield, and the amount of protein remaining in
the supernatant was measured by spectroscopy at optical
density (OD) of 280 nm and HPLC.

Results:

Rituximab SPPs formed.

20 Example 7 Preparation of Albumin SPPs

Albumin SPPs were obtained from vapor
diffusion hanging drops.

Method:

An aliquot of a 200 mg/ml stock solution of
25 Albumin (in water) was mixed in a 1:1 ratio with a
solution of 0.05 M potassium dihydrogen phosphate, pH
5.5 and 20% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 8000 and
placed on a plastic coverslip. 1 ml of a reservoir
solution containing 0.05 M potassium dihydrogen
30 phosphate, pH 5.5., 20% (w/v) PEG 8000 was placed in
the well (reservoir) of a 24-well Linbro plate (ICN
Biomedicals, Inc.). The coverslip was then inverted
over the well (reservoir) of the Linbro plate and

WO 03/000014

PCT/US02/19870

88

sealed with vacuum grease. Then the hanging drop solution was allowed to slowly equilibrate with the reservoir solution.

Results:

5 Albumin SPPs formed overnight in the hanging drops.

Example 8 Preparation of Spherical Protein Particles, Spherical Nanocrystalline Composite Particles
10 or Crystalline SPPs Using Polyethylene Glycol (PEG)

This example illustrates a method of preparing SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of various proteins, including, *inter alia*, enzymes (e.g., urease, glucose oxidase), protein hormones (e.g., human growth hormone), viruses, viral proteins, antibodies (e.g., Infliximab, Rituximab, Trastuzumab), antibody fragments, receptors, and peptides (e.g., calcitonin).

Procedure:

Aliquots of 40% PEG of MW 2000-8000 are added to 200 μ l of a protein solution (at 5-20 mg protein per ml solution), slowly increasing concentration stepwise 25 by 1%, starting at 4% PEG and increasing stepwise up to 16.5% PEG. The mixtures are allowed to equilibrate for one hour at each concentration. Samples are periodically analyzed by microscopy to determine sphere formation. Protein content, yield, and the amount of 30 protein remaining in the supernatant is measured by spectroscopy at optical density (OD) of 280 nm and HPLC.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

89

Example 9 Preparation of Spherical Protein Particles, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs Using PEG-Monomethyl Ether (PEG-ME)

This example illustrates a method of preparing SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs of various proteins, 10 including, *inter alia*, enzymes (e.g., urease, glucose oxidase), protein hormones (e.g., human growth hormone), viruses, viral proteins, antibodies (e.g., Infliximab, Rituximab, Trastuzumab), antibody fragments, receptors, and peptides (e.g., calcitonin).

15 **Procedure:**
Aliquots of 40% PEG monomethyl ether (PEG-ME) of MW 3350 are added to 200 µl of a protein solution (at 5-20 mg protein per ml solution), slowly increasing concentration stepwise by 1% beyond 4% up to 12% PEG.
20 The mixtures are allowed to equilibrate for one hour at each concentration. Samples are periodically analyzed by microscopy to determine sphere formation. Protein content, yield, and the amount of protein remaining in the supernatant is measured by spectroscopy at optical
25 density (OD) of 280 nm and HPLC.

Example 10

The SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP preparation methods exemplified above may be carried out using buffers 30 other than ammonium sulfate, sodium formate, PEG and PEG-ME, including, *inter alia*, lithium sulfate and MPD.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

90

Example 11 Selective fractionation/purification of Infliximab, Rituximab, and Trastuzumab from milk proteins by preparation of SPPs

5

This example contains a method of fractionating/purifying Infliximab, Rituximab, and Trastuzumab, by preparation of SPPs. This method may be used to purify numerous other proteins, including, 10 *inter alia*, enzymes (e.g., urease, glucose oxidase), protein hormones (e.g., human growth hormone), viruses, viral proteins, antibodies, antibody fragments, receptors, and peptides (e.g., calcitonin).

Materials:

15 Raw milk was purchased at a local farm (Crystal Brook Farm, Sterling, MA) and stored at 4°C.

Procedure:

A 100 ml aliquot of milk was transferred to two (50 ml each) 50 ml centrifuge tubes and de-fatted 20 by centrifugation at 9500 rpm for 15 minutes at 4°C. The cream layer was punctured using a sharp pipet tip and the skim milk was decanted into a clean tube through the opening. The skim milk was then re-centrifuged (9500 rpm for 15 minutes at 4°C) to remove 25 any residual fat. The skim milk was then clarified by adding an equal volume of 250 mM EDTA. The milky appearance cleared, indicating the destruction of micellar structures and aggregates. Each 50 ml aliquot of EDTA-clarified skim milk was then dialyzed at 4°C 30 against 1 liter of phosphate-buffered saline (PBS) to remove the EDTA. The dialyzed solution was then centrifuged at 10,000 rpm for 20 minutes and then passed through a 0.2 µm filter and assayed for protein

WO 03/000014

PCT/US02/19870

91

concentration. The milk had a final protein concentration of approximately 7 mg/ml. Three of the clarified milk aliquots were then spiked with an equal volume of stock Infliximab, Rituximab, or Trastuzumab 5 solution, to a final concentration of approximately 5-12 mg/ml protein. The purification of the Infliximab, Rituximab, and Trastuzumab proteins that had been spiked into clarified milk was performed as follows:

200 µl of a protein/clarified milk solution 10 was dialyzed against 3.9 ml of a buffer consisting of 1.8 M ammonium sulfate, 0.05 M sodium acetate, pH 5.8, and 0.5% propylene glycol at 4°C for 18 hours, using a dialysis membrane with a 10,000 MW cut-off. After 18 hours, the protein solution was then washed twice in 15 800 µl of a solution containing of 1.8 M ammonium sulfate, 0.5% propylene glycol, and 0.05 M sodium acetate, pH 5.8, centrifuged, and resuspended in approximately 200 µl of the same solution.

Results:

20 Infliximab, Rituximab, and Trastuzumab were fractionated/purified away from the milk proteins. See Figure 8.

In addition to using SPPs, the method according to this example may be used to 25 fractionate/purify proteins by preparation of spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs.

Example 12

30 The SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP preparation conditions exemplified above are useful for any clinically relevant protein. Clinically relevant proteins may be

classified according to the therapeutic area in which they are to be employed. Such proteins include, but are not limited to, commercially available proteins, including antibodies, including, but not limited to:

5 (1) Abciximab (ReoPro™): (anti-GPIIB/IIIa receptor; for the treatment of cardiovascular disease) (Centocor, Leiden, The Netherlands),
10 (2) Palivizumab (Synagis™): (anti-F protein on RSV; respiratory disease) (manufactured by MedImmune (Gaithersburg, MD))
15 (3) Murumonab-CD3 (Orthoclone™): (anti-CD3 antibody; for tissue transplant rejection) (OrthoBiotech, Raritan, NJ),
20 (4) Gentuzumab (Mylotarg™): (cancer) (Wyeth Labs, Philadelphia, PA),
(5) Basiliximab (Simulect™): (anti-CD25 antibody; for tissue transplant rejection) (Novartis, Basel, Switzerland),
25 (6) Daclizumab (Zenapax™): (anti-CD25 antibody; for tissue transplant rejection) (Protein Design Labs, Fremont, CA),
(7) Zevalin: (radioimmunotherapy for cancer) (IDEA Pharmaceuticals, San Diego, CA),
30 (8) Mylotarg™: (anti-CD33 antibody).

25 Example 13 Removal of Antibody Aggregates
 During Formation of Antibody SPPs,
 Spherical Nanocrystalline Composite
 Antibody Particles or Crystalline
30 Antibody SPPs:

This example illustrates a method for the removal of antibody aggregates from an antibody preparation. Precipitants including, *inter alia*,

WO 03/000014

PCT/US02/19870

93

ammonium sulfate, formate and PEG, which are used to form SPPs also serve to remove protein aggregates at lower concentrations.

Procedure:

5 Obtain antibody solution (at 10 mg/ml antibody) that contains aggregates. Determine the extent of protein aggregation by size exclusion chromatography. In increments, add stock solutions of either 2 M ammonium sulfate, 40% PEG (to a final 10 concentration up to 6.5% PEG, depending upon the protein in question) or 8 M formate (to a final concentration of approximately 0.9 M, again depending on the protein in question). The aggregated protein precipitates out first, leaving the non-aggregated 15 protein in solution. Protein distribution between pellet and solution is followed by HPLC.

Example 14

Secondary structure

characterization by FTIR:

20 The following method is especially useful for measuring the secondary structure of proteins. Specifically, it can be used for measuring the β -sheet content or the α -helical content of a protein being assayed. In this way, the secondary structure of the 25 protein component of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs maintained in mother liquor, or of proteins derived from dissolving SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, may be compared to their native, 30 soluble counterparts. In this way, the effect of, e.g., 1) forming SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, 2) short- or long-term storage, and 3) generating compositions or

WO 03/00014

PCT/US02/19870

94

formulations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, on the native, biologically active protein, may be determined.

The correlation coefficient is calculated using protein analysis software from Nicolet, which easily allows the determination of the correlation coefficient between the previously saved reference spectrum and that of the current protein spectrum (Garland, B, *FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States*. Nicolet application note # AN 9479). The second derivative spectrum of the native aqueous protein is used as a reference spectrum and the dried SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and lyophilized solid protein can be used as samples. The proteins will have an increasingly similar secondary conformational structure as the correlation coefficient approaches unity. Denaturation is indicated by a correlation coefficient of less than 0.8, which indicates that 1) the β -sheet content of the native protein has either increased or decreased, or 2) the α -helical content of the native protein has decreased only (i.e., whereas the β -sheet content of a protein could increase or decrease upon denaturation, the α -helical content of a protein always decreases upon denaturation). Therefore, a correlation coefficient of less than 0.8 indicates a change of secondary structure due to denaturation of the protein being assayed, relative to the native, biologically active form of the protein.

A correlation constant of 0.8-1.0 means that the secondary structure (i.e., β -sheet content and/or α -helical content) of the protein being assayed is from about 80% to about 100% identical to that of the

WO 03/000014

PCT/US02/19870

95

native, biologically active form of the protein.

Procedure:

The secondary structure of Trastuzumab SPPs made according to the method of Example 3, Infliximab SPPs made according to the method of Example 1, and Rituximab SPPs made according to the method of Example 2 maintained in suspension in their respective mother liquor was compared to the secondary structure of their native, soluble counterparts. The Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the SPPs in suspension and of the native, soluble antibodies were collected on a Nicolet model 550 Magna series spectrometer as described by Dong et al. [Dong, A., Caughey, B., Caughey, W.S., Bhat, K.S. and Coe, J.E. *Biochemistry*, 1992; 31:9364-9370; Dong, A. Prestreelski, S.J., Allison, S.D. and Carpenter, J.F. *J.Pharm. Sci.*, 1995; 84: 415-424.]. The FTIR spectra of the SPPs in suspension was then compared to that of their respective native, soluble counterparts.

The correlation coefficient was calculated using protein analysis software from Nicolet which easily allows the determination of the correlation coefficient between the previously saved reference spectrum and that of the current protein spectrum (Garland, B, *FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States*. Nicolet application note # AN 9479).

The FTIR spectra of 1 ml of each of the SPP solutions (maintained on suspension in mother liquor) at approximately 10 mg SPP per ml was analyzed using the attenuated total reflectance (ATR) mode. The spectra were collected and then processed using Grams 32 (from Galactic Software, Salem, NH) for the determination of relative areas of the individual

WO 03/000014

PCT/US02/19870

96

components of secondary structure using second derivative and curve-fitting program under amide I region (1600-1700 cm⁻¹).

Results:

5 A correlation coefficient of greater than 0.8 was obtained for the Trastuzumab SPPs as compared to native, soluble Trastuzumab, indicating that the process of forming Trastuzumab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native 10 structure by more than 20%. This is corroborated by the nearly identical spectra seen in Figure 2.

A correlation coefficient of greater than 0.8 was obtained for the Infliximab SPPs as compared to native, soluble Infliximab, indicating that the process 15 of forming Infliximab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native structure by more than 20%. This is corroborated by the nearly identical spectra seen in Figure 3.

A correlation coefficient of greater than 0.8 20 was obtained for the Rituximab SPPs as compared to native, soluble Rituximab, indicating that the process of forming Rituximab SPPs did not harm the integrity of the intact antibody or alter its native structure by more than 20%. This is corroborated by the nearly 25 identical spectra seen in Figure 4.

FTIR analysis according to this example may be used to determine the secondary structure of any protein that exists as the protein component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or 30 crystalline SPP, wherein the SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP is maintained in its mother liquor. FTIR analysis according to this example may be used for any protein obtained from dissolving SPPs, spherical

WO 03/000014

PCT/US02/19870

97

nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or for SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs that have been dried into solid samples. For the solid samples, the diffuse reflectance mode is used instead of the attenuated total reflectance (ATR) mode used for proteins, SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in suspension. For solid samples, the protein is lightly ground with 350 mg of KBr powder and filled into small cups used for diffuse reflectance accessory.

Example 15 Bioimmunoassays for the
Determination of Biological
Activity of Antibodies

15 The biological activity of an antibody may be characterized and measured by so-called bioimmunoassays that include, *inter alia*, the three bioimmunoassays described below. These assays are useful for comparing the residual biological activity of antibodies derived 20 from antibody SPPs, spherical nanocrystalline composite antibody particles or crystalline antibody SPPs with their soluble antibody counterparts. In this way, the effects of making SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs from 25 antibodies, short- or long-term storage, drying, and forming and subsequently dissolving SPP, spherical nanocrystalline composite particle and crystalline SPP compositions or formulations, may be determined and compared to the soluble counterpart of the antibody in 30 question.

The cytotoxicity of an antibody on its antigen bearing target cells can be characterized by

WO 03/00014

PCT/US02/19870

98

three assays, e.g. direct cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity (CDC), and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The target cells for Rituxan are the cells that overexpress CD-20
5 antigen on their surface, which include Raji, Daudi, JOK1 and WT100. The specific antigen for Herceptin is HER2 (human epidermal growth factor receptor 2 protein), which is overexpressed in human breast adenocarcinoma cell lines including SK-BR-3, BT474, and
10 MCF/HER2.

Example 16 Direct Cytotoxicity Bioimmunoassays
Comparing Rituximab from Dissolved
Rituximab SPPs with Native, Soluble
Rituximab

15 Direct Cytotoxicity:
 Direct cytotoxicity, as the name implies,
measures the intrinsic toxic effect of an antibody on
the target cell by co-incubating the target cells with
different concentrations of antibody. Cell viability
20 is counted after co-incubation with antibody.
 Procedure:
 1) RAJI lymphoma cells, (from American Type Cell
Collection (ATCC), Manassas, VA, ATCC # CCL 86) were
cultured in growth media and diluted to a final
25 concentration of 0.5×10^5 cells/ml in the same growth
media.
 2) 5000 cells (100 μ l) were transferred to each
well of a 96-well assay plate.
 3) In another 96-well plate, Rituximab obtained
30 from dissolving Rituximab SPPs (made according to the
method of Example 2) according to Example 18 and
native, soluble Rituximab were serially diluted in cell

WO 03/000014

PCT/US02/19870

99

culture media.

4) A 100 μ l aliquot of the diluted antibody solution was transferred to each well of the assay plate containing the cells. This produced a final 5 assay volume of 200 μ l of antibody/cell solution per well. Wells that contained cells without antibodies (100 μ l of growth media alone) were used as a control ("cells only" control). The plates were incubated at 37°C for 3 days.

10 5) After 3 days, 20 μ l of Promega Substrate Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent were added to each well.

15 6) The optical density (OD) at 490 nm was then read at 37°C. The absorbance at 490 nm in the wells containing dissolved Rituximab or its native, soluble counterpart was compared to the "cells only" control. A decrease in absorption as compared to the "cells only" control was an indicator of RAJI lymphoma cell 20 growth inhibition. The ability of Rituximab obtained from dissolving Rituximab SPPs to inhibit RAJI lymphoma cell growth was compared to that of native, soluble Rituximab.

Results:

25 Rituximab obtained from dissolving Rituximab SPPs according to Example 18 induced Direct Cytotoxicity of RAJI lymphoma cells that was comparable to that of its native, soluble Rituximab counterpart, assayed under identical conditions. See Figure 9.

Example 17 Complement dependent cytotoxicity
30 (CDC) Bioimmunoassays Comparing
 Rituximab from Dissolved Rituximab
 SPPs with Native, Soluble Rituximab

WO 03/00014

PCT/US02/19870

100

Complement dependent cytotoxicity (CDC):

A complement-dependant cytotoxicity reaction occurs when an antibody binds to its cell surface antigen, and thereby induces target cell destruction by activating the complement system (a series of interacting proteins that lyse cells and trigger local inflammatory reactions).

Procedure:

1) Raji lymphoma cells, (from American Type Cell Collection (ATCC), Manassas, VA, ATCC # CCL 86) were cultured in growth media and diluted to a final concentration of 0.5×10^5 cells/ml in the same growth media.

2) 5000 cells (100 µl) were transferred to each well of a 96-well assay plate, and cultured in the presence of either: Rituximab (at 25 µg/ml of cell culture media) obtained from dissolving Rituximab SPPs (made according to the method of Example 2) according to Example 19, or native, soluble Rituximab at 25 µg/ml of cell culture media, and various concentrations of human serum. Wells that contained cells without antibodies were used as a control ("cells only" control). The plates were incubated at 37°C for 3 days.

3) After the 3 day incubation period, the number of viable Raji lymphoma cells were counted in each well, using the CellTiter 96-Aqueous One Solution Proliferation Assay kit (Promega Corp. Madison, WI; Promega product no. G3580). The number of viable cells in the wells containing Rituximab obtained from dissolving Rituximab SPPs according to Example 18 was compared with the number of viable cells in wells containing native, soluble Rituximab and cells with no antibody (the "cells only" control).

Results:

WO 03/000014

PCT/US02/19870

101

See Figure 10.

Example 18 Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) Bioimmunoassays

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

5 (ADCC):

Similar to CDC, ADCC is one of the major mechanisms responsible for cytotoxicity of monoclonal antibodies. In contrast to CDC, the target cell destruction caused by ADCC is initiated by recruiting 10 immune cells, which specifically attack tumor cells, after an antibody binds to its specific antigen on the target cell. The ADCC assay is carried out by first seeding the wells/plates with a fixed amount of target cells (tumor cells), then co-incubating with antibody 15 and effector immune cells (usually isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)). The cell viability is determined at the end of co-incubation. Cell death is significantly increased with the presence of the effector immune cells compared with the control (target 20 cell plus antibody only).

Procedure:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are prepared from the buffy coats of healthy blood donors. The buffy coats are first diluted in phosphate-buffered 25 saline (PBS) and the PBMCs are prepared by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation according to the method of Boyum et al., (Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 97, 77-89) (1968). The cells are suspended in medium containing heat-inactivated 30 fetal calf serum (FCS) and 10% dimethylsulfoxide, then aliquoted and freeze-stored in liquid nitrogen until further use. PBMCs are thawed, washed 3 times in same

WO 03/00014

PCT/US02/19870

102

medium and once in PBS, incubated with red membrane dye PKH-26 (Sigma Chemical Co.) at 2 μ M for 4 min. The reaction tube is agitated slightly at room temperature.

Lymphoma cell lines, e.g., RAJI and DUADI (DSMZ, Braunschweig, Germany) are maintained in exponential growth conditions in 12.5 ml medium in plastic 25-cm² culture flasks (Greiner, Solingen, Germany). The cells are harvested, washed in PBS and incubated with PKH-2 (green fluorescence) at 2 μ M for 10 min. Staining is stopped by addition of FCS and the labelled cells washed 3 times with medium. Cell counts are performed to determine the number of viable cells surviving the staining process. Cell counts are performed using trypan blue stain in a Neubauer chamber and uniform cell labeling is ascertained by UV fluorescence microscopy. Lymphoma cells and PBMCs are seeded in a 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc, Denmark). Next, the antibody of choice is added, along with fresh drawn human serum (as a source of complement), and cytokines. The plates are then incubated for 3 days at 37°C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. After incubation, the plates are washed in PBS. Following the wash step, 50 μ l of PBS supplemented with warm EDTA (to 0.02% final concentration) and trypsin (to 0.05% final concentration), are added to each well. After incubation for 10 minutes, the plates are agitated on a plate shaker for 1 minute. A 200 μ l aliquot of PBS containing 45% FCS are added (to block trypsin activity), propidium iodide (12.5 μ g/ml) is added for labeling of dead cells, and FITC-labelled chronic lymphocyte leukemia lymphocytes (150,000 cells/ml, i.e., 30,000 cells per 200 μ l) are added as standards for cell count determination. All sample analysis is

WO 03/000014

PCT/US02/19870

103

performed by flow cytometry in a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer using identical gates and instrument settings. The number of viable tumor cells in each well is calculated using the
5 formula:

Viable Tumor Cells = 30,000 x (Events (tumor cell gate) /Events (standard Cell gate)),
where 30,000 is the number of standard cells added to each well.

10 Example 19 Soluble protein sample preparation:

For comparison to its native, soluble counterpart, the protein component of SPPs, spherical
15 nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs produced in Examples 1-9 is prepared by dissolving (resuspending) the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs to a final concentration of about 10 to about 20 mg/ml in 0.1%
20 Tween 80 and 25 mM Tris-HCl, pH 7.0 at 37°C.

Example 20 Stability of SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs:

The stability Rituximab or Trastuzumab SPPs,
25 prepared according to Examples 2 and 3, was compared to the stability of their native, soluble counterpart proteins.

Figure 5 shows a comparison of the stability of Rituximab SPPs and native, soluble Rituximab, stored
30 at 4°C for the same period of time. The Rituximab SPPs

WO 03/000014

PCT/US02/19870

104

were dissolved according to the method in Example 19. The analysis was performed by SEC-HPLC. The results show that the Rituximab SPPs were not degraded while in storage.

- 5 Figure 7 is a picture of an SDS-PAGE gel when Trastuzumab and Rituximab SPPs, made according to Examples 3 and 2, respectively, were stored at 4°C under the same conditions and for the same length of time as native, soluble Trastuzumab and Rituximab.
- 10 After being stored, the native, soluble Trastuzumab and Rituximab, and dissolved Trastuzumab and Rituximab SPPs (dissolved according to Example 19), were electrophoresed using SDS-PAGE. Figure 7 demonstrates that Trastuzumab and Rituximab SPPs are stable when 15 stored under the same conditions as their native, soluble counterparts.

The stability of any SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, or composition or formulation thereof, according to 20 this invention may be tested versus their native, soluble counterparts using the methods of this example.

- Example 21 Formulation of SPPs, Spherical nanocrystalline composite Particles or Crystalline SPPs using polyethylene oxide(PEO) as excipient.

In order to enhance the stability of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs during drying and storage, the SPPs, 30 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs may be formulated with excipients. SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or

WO 03/000014

PCT/US02/19870

105

crystalline SPPs may be formulated using 0.1% polyethylene oxide in water as follows. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are separated from the preparation 5 buffer by centrifugation at 1000 rpm in a Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped with swinging bucket rotor. Next, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are suspended in 0.1% polyethylene oxide for 3 hrs (Sigma Chemical 10 Co., St. Louis, MO) and then separated by centrifugation.

Example 22 Formulation of SPPs, Spherical nanocrystalline composite Particles or Crystalline SPPs using sucrose
15 as excipient:

In this example, sucrose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) is added as an excipient to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs in preparation buffer. Sufficient 20 sucrose is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs to reach a final sucrose concentration of 10% (w/v). The resulting suspension is then tumbled at room temperature for 3 hr. After treatment with sucrose, 25 the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are separated from the liquid by centrifugation, as described in Example 21.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

106

Example 23 Formulation of SPPs, Spherical nanocrystalline composite Particles or Crystalline SPPs using trehalose as excipient:

5 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are formulated as in Example 22, by adding trehalose instead of sucrose, (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), to a final concentration of 10% (w/v) in preparation buffer. The 10 resulting suspension is then tumbled at room temperature for 3 hr and the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are separated from the liquid by centrifugation, as described in Example 21.

15 Example 24 Formulation of SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs using methoxypolyethylene glycol (MOPEG) as excipient:

20 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are formulated as in Example 22, by adding methoxypolyethylene glycol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) instead of sucrose, to a final concentration of 10% (w/v) in preparation buffer 25 and separating after 3 hrs by centrifugation, as described in Example 21.

Example 25 Making Stable Rituximab and Trastuzumab SPPs that are Particularly Suitable for

WO 03/00014

PCT/US02/19870

107

Parenteral Injection

The high ammonium sulfate content (2.1 M) of the mother liquor used in making Rituximab and Trastuzumab SPPs according to the methods of Examples 2 5 and 3, respectively, is disadvantageous when the SPPs are intended for delivery to a human, or another animal, via parenteral injection. The following method was used to reduce the ammonium sulfate content of SPP solutions intended for parenteral delivery to animals 10 including, *inter alia*, humans.

Rituximab and Trastuzumab SPPs were made according to Examples 2 and 3, respectively. The mother liquor was removed from the Rituximab and Trastuzumab SPP solutions by centrifugation at 2000 rpm 15 for 10 minutes at room temperature. Rituximab SPPs were resuspended in a solution consisting of 16% PEG 1500, 9% ethanol, 4.5% glycofurool, 4.5% Pluronic F127 and 0.09 M trehalose. Trastuzumab SPPs were resuspended in a solution consisting of 16% PEG 1500, 20 9% ethanol, 4.5% glycofurool, 4.5% Pluronic F127, 0.09 M trehalose and 4.5% propylene glycol. The centrifugation step was repeated twice and the Rituximab and Trastuzumab SPPs were resuspended in the same respective solutions at a final concentration 25 (protein in solution) of 10 mg/ml.

Results:

The Rituximab and Trastuzumab SPP solutions made according to this example, and their soluble counterparts, were stored for two weeks at 26°C. At 30 weeks 1 and 2, the stability of the Rituximab and Trastuzumab SPPs was found to be comparable to that of their native, soluble counterparts. See Figure 16.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

108

Example 26Methods of Drying SPPs, Spherical Nanocrystal Composite Particles or Crystalline SPPs, or Compositions or Formulations Thereof:

5 Method 1. N₂ Gas Drying at Room Temperature:
SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or
crystalline SPPs, or compositions and formulations
thereof, are separated from the preparation buffer
containing excipient by centrifugation at 1000 rpm in a
10 Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped with
swinging bucket rotor in a 50 ml Fisher brand
Disposable centrifuge tube (Polypropylene). The SPPs,
spherical nanocrystalline composite particles or
crystalline SPPs are then dried by passing a stream of
15 nitrogen at approximately 10 psi pressure into the tube
overnight.

Method 2. Vacuum Oven Drying:

20 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or
crystalline SPPs, or compositions and formulations
thereof, are first separated from the preparation
buffer/excipient solution using centrifugation at 1000
rpm in a Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped
with swinging bucket rotor in a 50 ml Fisher brand
Disposable polypropylene centrifuge tube. The wet
25 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or
crystalline SPPs are then placed in a vacuum oven at 25
mm pressure in Hg (VWR Scientific Products) at room
temperature and dried for at least 12 hours.

Method 3. Lyophilization:

30 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or
crystalline SPPs, or compositions and formulations

WO 03/00014

PCT/US02/19870

109

thereof, are first separated from the preparation buffer/excipient solution using centrifugation at 1000 rpm in a Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped with swinging bucket rotor in a 50 ml Fisher brand
5 Disposable polypropylene centrifuge tube. The wet SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are then freeze dried using a Virtis Lyophilizer Model 24 in semistoppered vials. The shelf temperature will be slowly reduced to -40 °C during the
10 freezing step. This temperature will be held for 16 hrs. Secondary drying may then be then carried out for another 8 hrs.

Method 4. Organic Solvent and Air Drying:
SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or
15 crystalline SPPs, or compositions and formulations thereof, are first separated from the mother liquor/excipient solution using centrifugation at 1000 rpm in a Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped with swinging bucket rotor in a 50 ml Fisher brand
20 Disposable polypropylene centrifuge tube. The SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are then suspended in an organic solvent like ethanol or isopropanol or ethyl acetate or other suitable solvents, and centrifuged. The
25 supernatant is then decanted and the SPPs are air dried or dried under a gentle stream of nitrogen at room temperature in the fume hood for about 30 minutes to about two days (depending on SPP sample size), until the SPPs are completely dry.

30 Method 5. Air Drying at Room Temperature:
SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions and formulations

WO 03/00014

PCT/US02/19870

110

thereof, are separated from the preparation buffer containing excipient by centrifugation at 1000 rpm in a Beckman GS-6R bench top centrifuge equipped with swinging bucket rotor in a 50 ml Fisher brand
5 Disposable centrifuge tube (Polypropylene). Subsequently, the SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs are then allowed to air dry in the fume hood for two days.

10 Method 6. Spray Drying:
SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or compositions and formulations thereof, are spray dried using a Buchi Mini Spray Dryer Model B-191. The SPPs, spherical nanocrystalline
15 composite particles or crystalline SPPs, at a concentration of 30 to 50 mg/ml, are used for spray drying.

Example 27 Drying Rituximab SPPs:

Rituximab crystals were made according to the
20 method of Example 6, and dried according to method 4 of Example 26.

Drying Rituximab SPPs:
A solution containing 1.5 mg of Rituximab SPPs in mother liquor was centrifuged at 1000 rpm for
25 10 minutes at room temperature. The mother liquor was then removed from the Rituximab SPPs, and the Rituximab SPPs were resuspended in 6% Pluronic F127 (a surfactant) (gift from the BASF corporation) in 70% 2-Propanol (isopropanol). This solution was then
30 centrifuged at 1000 rpm until the solvent could be removed (10 minutes at room temperature). The solvent was removed and the Rituximab SPPs were resuspended in

WO 03/00014

PCT/US02/19870

111

solution of 25% Propylene glycol/75% 2-Propanol. This solvent was then removed from this solution by centrifugation at 1000 rpm (10 minutes at room temperature), and the Rituximab SPPs were resuspended 5 in 100% 2-propanol. The 2-propanol was then removed from this solution by centrifugation at 1000 rpm (10 minutes at room temperature). The Rituximab SPPs were then dried in a gentle stream of nitrogen. Because the sample size was small (1.5 mg), the SPPs were 10 completely dried after 45 minutes.

Example 28 Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate HCl
(DTBP) Crosslinking:

15 Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate HCl (DTBP) solution is prepared by dissolving 27.9 mg of DTBP in 60 ml of water. A 40 ml aliquot of this solution is then added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs 20 (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is 25 discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of DTBP is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess 30 reagent five times, with 1 ml each time of 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

112

Example 29 Dithiobis (succinimidylpropionate)
(DSP) Crosslinking:

Dithiobis (succinimidylpropionate) (DSP) solution is prepared by dissolving 36 mg of DSP in 60 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD).

10 Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and

15 20% MPD. An additional amount of DSP is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off (five times with 1 ml of buffer each time) excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM

20 calcium chloride and 20% MPD.

Example 30 Bis maleimidohexane (BMH)
Crosslinking:

Bis maleimidohexane (BMH) solution is prepared by dissolving 12 mg of BMH in 40 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried

30 out at ambient temperature for 24 hours with tumbling.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

113

Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of BMH is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

10 Example 31 Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate
(BS) Crosslinking:

Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate (BS) solution is prepared by dissolving 29 mg of BS in 50 ml of water. A 40 ml aliquot of this solution is added to 15 SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. Then, the 20 slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of BS is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. 25 The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

30 Example 32 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene
(DFDNB) Crosslinking:

1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB)

WO 03/000014

PCT/US02/19870

114

solution is prepared by dissolving 10 mg of DFDNB in 40 ml of acetone. A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of DFDNB is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 33 Dimethylsüberimidate.2HCl
(DMS) Crosslinking:

Dimethylsüberimidate.2HCl (DMS) solution is prepared by dissolving 33 mg of DMS in 40 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at for 24 hours with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of DMS is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking reaction is terminated by washing off

WO 03/00014

PCT/US02/19870

115

excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

5 Example 34 Disuccinimidyl glutarate
(DSG) Crosslinking:

Disuccinimidyl glutarate (DSG) solution is prepared by dissolving 17 mg of DSG in 50 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. After that, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of DSG is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated 20 by washing excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

25 Example 35 Disulfosuccinimidyl tartarate
(Sulfo-DST) Crosslinking:

Disulfosuccinimidyl tartarate (Sulfo-DST) solution is prepared by dissolving 27 mg of Sulfo-DST in 50 ml of water. A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient

WO 03/000014

PCT/US02/19870

116

temperature for 24 hours with tumbling. After that, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of Sulfo-DST is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 10 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 361-Ethyl-3-[3-
Dimethylaminopropyl]carbodiimide
hydrochloride (EDC) Crosslinking:

1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) solution is prepared by dissolving 10 mg of EDC in 1 ml of water. A 200 ml aliquot of this solution and 5 mg of solid Sulfo-NHS is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. After 24 hours, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended 20 in 50 mM MES buffer, pH 6 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of EDC + Sulfo-NHS is added (200 ml + 5 mg Sulfo-NHS) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess 25 reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

WO 03/00014

PCT/US02/19870

117

Example 37 Ethylene
glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate]
(Sulfo-EGS) Crosslinking:

Ethylene
5 glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate] (Sulfo-EGS)
solution is prepared by dissolving 33 mg of Sulfo-EGS
in 40 ml water. A 40 ml aliquot of this solution is
added to SPPs, spherical nanocrystalline composite
particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM
10 HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride
and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient
temperature for 24 hours with tumbling. Then, the
slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant
is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM
15 HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride
and 20% MPD. An additional amount of Sulfo-EGS is
added (20 ml) and crosslinking is continued for another
24 hours. The crosslinking is terminated by washing
off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH
20 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5
with 1 ml of buffer).

Example 38 N-[g-maleimidobutyryloxy]
succinimide ester (GMBS)
Crosslinking:

25 N-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester
(GMBS) solution is prepared by dissolving 23 mg of GMBS
in 50 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml aliquot
of this solution is added to SPPs, spherical
nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs
30 (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5
containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD).

WO 03/000014

PCT/US02/19870

118

Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours, with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of GMBS is added (20 ml) and crosslinking is continued for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 39 N-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB)
Crosslinking:

15 N-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB) solution is prepared by dissolving 5 mg of Sulfo-HSAB in 40 ml of water. A 40 ml aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5
20 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours, with tumbling. Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended
25 in 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD, and a second crosslinking is carried out at ambient temperature for 10 minutes with shaking using 254 nm UV light (by keeping the UV lamp 2.5 cm away from the sample). After 10 minutes, the
30 slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate

WO 03/00014

PCT/US02/19870

119

buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 40 Sulfosuccinimidyl-6-[a-methyl-a-(2-pyridylidithio)toluamido] hexanoate
5 (Sulfo-LC-SMPT) Crosslinking:

Sulfosuccinimidyl-6-[a-methyl-a-(2-pyridylidithio)toluamido] hexanoate (Sulfo-LC-SMPT) solution is prepared by dissolving 12 mg of Sulfo-LC-SMPT in 60 ml of water. A 40 ml aliquot of this 10 solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs (21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 24 hours with tumbling. 15 Then, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The pellet is then suspended in 10 mM HEPES buffer, pH 7.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. An additional amount of Sulfo-LC-SMPT is added (20 ml) and crosslinking is continued 20 for another 24 hours. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 41 Bis-[b-(4-azidosalicylamido) ethyl]disulfide (BASED)
25 Crosslinking:

Bis-[b-(4-azidosalicylamido) ethyl]disulfide (BASED) solution is prepared by dissolving 3 mg of BASED in 40 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). A 40 ml 30 aliquot of this solution is added to SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs

WO 03/00014

PCT/US02/19870

120

(21 mg in 1.5 ml of 10 mM HEPES buffer, pH 8.5 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD). Crosslinking is carried out at ambient temperature for 30 minutes with shaking using 365 nm UV light (by 5 keeping the UV lamp 2.5 cm away from the sample). After 30 minutes, the slurry is centrifuged at 3000 rpm and the supernatant is discarded. The crosslinking is terminated by washing off excess reagent with 10 mM sodium acetate buffer, pH 4.8 containing 10 mM calcium 10 chloride and 20% MPD (x5 with 1 ml of buffer).

Example 42 Glutaraldehyde Crosslinking:

Rituximab SPPs, prepared according to the method of Example 2, were crosslinked by adding untreated neat glutaraldehyde (Sigma) to a final 15 crosslinker concentration of 0.1%. Crosslinking was allowed to proceed for 1 hour. The SPPs or crystalline SPPs were recovered by low speed centrifugation and were washed with 10 mM Tris buffer, pH 7.0.

Example 43 Reversible Crosslinkers - Disulfide Crosslinked SPPs, Spherical Nanocrystalline Composite Particles or Crystalline SPPs:

SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs may be crosslinked using 25 one of the following crosslinkers:
1) Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate.HCl - (DTBP) (Pierce)
2) Dithiobis (succinimidylpropionate) - (DSP) (Pierce)
30 Crosslinking is carried out in 1.5 ml

WO 03/000014

PCT/US02/19870

121

microcentrifuge tubes (USA/Scientific) by placing 250 ml of SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP solution (21 mg) in 500 ml of buffer (10 mM HEPES, pH 8.5 containing 10 mM calcium acetate and 20% MPD). One crosslinker is added to each tube as follows: A) DTBP (60 mM) (27.9 mg of DTBP is dissolved in 60 ml of water and add 20 ml of the solution); and B) DSP (14.84 mM) (36 mg of DSP is dissolved in 120 ml of DMSO and add 10 ml of the solution).

- 10 The tubes are tumbled at ambient temperature (24-26°C) until all samples are determined to be insoluble in 32 mM NaOH (2 days) (using 50 ml sample in 150 ml of NaOH). Uncrosslinked samples are readily soluble in 32 mM NaOH at the same concentrations.
- 15 Crosslinking is stopped by centrifuging the sample at 3000 rpm for 5 minutes, and discarding the supernatant and by the addition of 1 ml of 10 mM Tris.HCl buffer, pH 7.0 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD and repeating the washing procedure three times.

20 Example 44 Dissolution of Disulfide Bond-
Containing Crosslinked SPPs or SPP
crystals:

A 200 mM solution of cysteine is prepared by dissolving 242 mg of cysteine in 10 ml of 10 mM Tris HCl buffer, pH 7 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD. A 200 ml sample of crosslinked SPP, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs is taken and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and 30 the supernatant is discarded. The pellet is suspended in 200 ml of cysteine containing Tris buffer. Another 200 ml of crosslinked sample is taken and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the supernatant is

WO 03/000014

PCT/US02/19870

122

discarded. The pellet is then suspended in 200 ml of Tris buffer without any cysteine. All samples are incubated at 37°C for 1 hour and monitored for dissolution in 32 mM NaOH (direct visual and 5 microscopic observation).

After incubation for 1 hour at 37°C, the DTBP sample is fully soluble in the presence of cysteine and insoluble in its absence. The DSP sample is barely soluble in the presence of cysteine and insoluble in 10 its absence.

Example 45 Characterization of pH
Solubility of Crosslinked
SPPs, Spherical Nanocrystalline
Composite Particles or Crystalline
15 SPPs at 37°C:

The solubility of various SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, crosslinked with Dimethyl 3, 3'-dithiobispropionimidate.HCl (DTBP), Dithiobis 20 (succinimidylpropionate) (DSP), Bis maleimido hexane (BMH), Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate (BS), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzene (DFDNB), Dimethylsuberimidate.2HCl (DMS), Disuccinimidyl glutarate (DSG), Disulfosuccinimidyl tartarate (Sulfo- 25 DST), 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC), Ethylene glycolbis[sulfosuccinimidylsuccinate] (Sulfo-EGS), N-[g-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS), N-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate (Sulfo-HSAB), 30 Sulfosuccinimidyl-6-[a-methyl-a-(2-pyridyl)dithio)toluamido] hexanoate (Sulfo-LC-SMPT), Bis-[b-(4-azidosalicylamido) ethyl]disulfide (BASED) or

WO 03/000014

PCT/US02/19870

123

glutaraldehyde (GA), may be studied using this method.

In 1.5 ml Eppendorf tubes, samples of uncrosslinked SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, and crosslinked SPPs, 5 spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPP preparations, equal to 2.8 mg protein, are microfuged at 3000 rpm for 5 minutes and the supernatant liquid is removed. Two pHs are tested: a) pH 7.4 and b) pH 2.0.

10 For pH 7.4, a 200 ml aliquot of PBS buffer (0.01 M phosphate, 0.0027 M potassium chloride, 0.137 M sodium chloride, pH 7.4) is added to each sample, bringing the concentration of protein to 14 mg/ml. The samples are incubated at 37°C for 24 hours.

15 For pH 2.0, a 200 ml aliquot of glycine.HCl buffer pH 2.0 is added to each sample, bringing the concentration of protein to 14 mg/ml. The samples are incubated at 37°C for 5 hours. Initially, the samples are treated with 10 mM glycine.HCl buffer, pH 2.0 20 containing 10 mM calcium chloride and 20% MPD overnight at 25°C with tumbling; then proceeding with glycine.HCl buffer alone.

25 Samples are studied for dissolution by centrifuging the samples at 14,000 rpm for 5 minutes after 24 hours/5 hours and the supernatant is passed through 0.22 mm filter. The protein is estimated by removing 2 ml of the aliquot and placing it in 798 ml of deionized water. A 200 ml aliquot of Bio-Rad Protein assay reagent is added to this sample and the 30 sample is then incubated at ambient temperature for 5 minutes and measured at 595 nm wavelength (Bio-Rad micro protein assay by Bradford's method). As a standard, bovine serum albumin from Pierce is used in the range of about 0-20 mg protein.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

124

Example 46Tertiary structure characterization
by FTIR:

The following method is useful for measuring
5 the tertiary structure of a protein being assayed. In
this way, the tertiary structure of proteins derived
from dissolving SPPs, spherical nanocrystalline
composite particles or crystalline SPPs may be compared
to their native, soluble counterparts. In this way,
10 the effect of, e.g., 1) forming SPPs, spherical
nanocrystalline composite particles or crystalline
SPPs, 2) short- or long-term storage, and 3) generating
compositions or formulations of SPPs, spherical
nanocrystalline composite particles or crystalline
15 SPPs, on the native, biologically active protein, may
be determined.

The fourier transform infrared (FTIR) spectra
are collected on a Nicolet model 550 Magna series
spectrometer, as described by Dong et al. [Dong, A.,
20 Caughey, B., Caughey, W.S., Bhat, K.S. and Coe, J.E.
Biochemistry, 1992; 31:9364-9370; Dong, A.
Prestrelski, S.J., Allison, S.D. and Carpenter, J.F.
J.Pharm. Sci., 1995; 84: 415-424.]

For the solid samples, 1 to 2 mg of the
25 protein are lightly ground with 350 mg of KBr powder
and filled into small cups used for diffuse reflectance
accessory.

Alternatively, for solution analysis,
attenuated total reflectance (ATR) is used instead of
30 diffuse reflectance.

The spectra are collected and then processed
using Grams 32 (from Galactic Software), for the
determination of relative areas of the individual
components of secondary structure using second

WO 03/00014

PCT/US02/19870

125

derivative and curve-fitting program under amide I region (1600-1700 cm⁻¹).

The correlation coefficient is calculated using protein analysis software from Nicolet, which 5 easily allows the determination of the correlation coefficient between the previously saved reference spectrum and that of the current protein spectrum (Garland, B, *FT-IR Studies of Protein Secondary Structure in Aqueous and Dried States*. Nicolet 10 application note # AN 9479). The second derivative spectrum of the native aqueous protein is used as a reference spectrum and dried SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs and lyophilized solid protein can be used as samples. 15 The proteins will have an increasingly similar tertiary conformational structure as the correlation coefficient approaches unity. Denaturation is indicated by a correlation coefficient of less than 0.8, which indicates that 1) the β -sheet content of the native 20 protein has either increased or decreased, or 2) the α -helical content of the native protein has decreased only (i.e., whereas the β -sheet content of a protein could increase or decrease upon denaturation, the α -helical content of a protein always decreases upon 25 denaturation). Therefore, a correlation coefficient of less than 0.8 indicates a change of tertiary structure due to denaturation of the protein being assayed, relative to the native, biologically active form of the protein.

30 Example 47

Secondary structure
characterization by Circular
Dichroism Spectroscopy:

WO 03/000014

PCT/US02/19870

126

Circular Dichroism (CD) is an optical characteristic of a molecule, which reflects asymmetric features of the molecular structure. CD spectroscopy is a method for measuring CD and is useful for the 5 rapid determination of a molecule's structural features. CD spectra allow characterization of the secondary structure of a protein, including the β -sheet content, the α -helical content, the β -turn content and the random coil content of a protein being assayed. CD 10 spectra further allow characterization of the type of structure of a nucleic acid including, *inter alia*, whether the nucleic acid molecule is in the A-form (A-DNA or A-RNA), B-form (B-DNA) or Z-form (Z-DNA). In this way, the secondary structure of proteins or 15 nucleic acids derived from dissolving SPPs, spherical nanocrystalline composite particles, crystalline SPPs, or spherical nucleic acid particles or spherical nanocrystalline composite nucleic acid particles or crystalline spherical nucleic acid particles may be 20 compared to their soluble counterparts. In this way, the effect of, e.g., 1) forming SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or spherical nucleic acid particles or spherical nanocrystalline composite nucleic acid particles or 25 crystalline spherical nucleic acid particles 2) short- or long-term storage, and 3) generating compositions or formulations of SPPs, spherical nanocrystalline composite particles or crystalline SPPs, or spherical nucleic acid particles or spherical nanocrystalline 30 composite nucleic acid particles crystalline spherical nucleic acid particles, on the native, biologically active protein or nucleic acid, may be determined.

Circular Dichroism (CD) is displayed when an optically active substance absorbs left or right handed

WO 03/00014

PCT/US02/19870

127

circularly polarized light preferentially. CD can define the secondary structure characteristics of proteins and peptides, including alpha helix, beta sheet, turn, and coil. CD spectroscopy has been used 5 to monitor: 1) secondary structure, 2) conformational changes, 3) environmental effects, 4) protein folding and denaturation, and 5) dynamics.

METHOD:

Infliximab SPPs, Rituximab SPPs and

10 Trastuzumab SPPs were made according to the methods of Examples 1-3, respectively. Infliximab SPPs, Rituximab SPPs and Trastuzumab SPPs were dissolved according to the method of Example 19. The secondary structures of the antibodies obtained from dissolved SPPs were 15 determined with a Jasco-810 circular dichroism spectrometer and were compared with the counterpart soluble protein obtained commercially. The protein SPP samples were dissolved and diluted with deionized water to a final concentration of 0.17-0.33 mg/ml. The 20 spectra were taken from 260 to 195 nm (wavelength in nanometers), using a standard 0.1 cm pathlength cuvette (200 µl sample size). For all three sets of samples (both dissolved SPPs and soluble proteins of Trastuzumab, Rituximab and Infliximab), the spectra 25 demonstrated dominating β-sheet structure and showed no significant differences between the spectra of dissolved SPP and soluble protein samples.

RESULTS: See Figures 11, 12 and 13.

Example 48 Conformation characterization
30 by ELISA
ELISAs measure the ability of a monoclonal antibody to recognize and bind to a specific epitope on a protein. Monoclonal antibodies bind primarily on the

WO 03/000014

PCT/US02/19870

128

global conformation of the epitope and the local conformation of the amino acids that make up the epitope. If a native protein becomes denatured, or its conformation is somehow altered, a monoclonal antibody 5 will no longer recognize it and bind to it. Thus, by using a monoclonal antibody that specifically binds a native, soluble counterpart to a protein component of an SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP, an ELISA is useful to compare the 10 antigenic structure of a protein from a dissolved SPP, spherical nanocrystalline composite particle or crystalline SPP with that of its native, soluble counterpart.

METHOD:

15 Protocol for Trastuzumab ELISA:
Corning Costar 96-well plates (Corning, Life Sciences Division, Acton, MA) were coated with 50 µl of goat anti-human IgG (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois) at a concentration of 10 µg/ml in 50 mM 20 carbonate buffer, pH 9.6. The plates were coated overnight at 4°C.

The next day, the anti-human antibody was aspirated off of the plates, after which the plates were washed 3 times with Tris-buffered saline with 25 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) (TBST).

Then, the plates were blocked by adding 200 µl blocking buffer (3% non-fat dry milk reconstituted in TBST) to each well of the plates. The plates were incubated in a dark room at room temperature (21-25°C) 30 for 2 hours.

While the plates were being blocked, the Trastuzumab samples (either Trastuzumab obtained from dissolving Trastuzumab SPPs (made according to the method of Example 3 and dissolved according to the

WO 03/000014

PCT/US02/19870

129

method of Example 19), or native, soluble Trastuzumab) were diluted to a final concentration of 10 ng/ml in dilution buffer (blocking buffer plus 1% normal mouse serum), and serially diluted 6 times, performing a 1:1 dilution each time. The final concentrations of the Trastuzumab samples were 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 1.25 ng/ml, 0.625 ng/ml, 0.3125 ng/ml and 0.15625 ng/ml.

After the plates were blocked for 2 hours, 10 they were washed 3 times with 200 µl/well TBST. Then, 100 µl of the appropriate diluted sample was added to the appropriate well of the plates. Wells containing blocking buffer only (without Trastuzumab) were used as a control. The plates were then incubated in a dark 15 room at room temperature (21-25°C) for 1 hour.

After the incubation period, the plates were washed 3 times with 200 µl/well TBST. Then, 100 µl of horseradish peroxidase-conjugated Fc-specific anti-human IgG (Sigma, St. Louis, MO) was added to each well 20 of the plates. The plates were then incubated in a dark room at room temperature (21-25°C) for 1 hour.

After the incubation period, the plates were washed 3 times with 200 µl/well TBST. Then, 100 µl of the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (in 25 the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2)) was added to each well. The plates were then incubated in a dark room at room temperature (21-25°C) for 30 minutes to allow the color to develop. The color reaction was then stopped by adding 100 µl of 1 N (Normal) sulfuric acid (H_2SO_4) to each well. The optical density (OD) of 30 the solution in each well was measured at a wavelength of 450 nm (OD_{450}) using a Molecular Devices "SpectraMAX plus" automatic plate reader with Softmax Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). The OD_{450} measured

WO 03/00014

PCT/US02/19870

130

for each well was directly proportional to the amount of Trastuzumab bound to the anti-human antibody coating the well.

RESULTS:

The Trastuzumab obtained from dissolving Trastuzumab SPPs had the same conformation as its native, soluble counterpart, demonstrating that the process of forming Trastuzumab SPPs did not alter the conformation of the native Trastuzumab antibody. See 10 Figure 14.

Example 49

Trastuzumab Animal Models

Trastuzumab may be used in the treatment of breast cancer [Pietras R.J., Poen J.C., Gallardo, D., Wongvipat P.N., Lee H.J. and Slamon D.J., Cancer Res, 15 vol. 59, pp. 1347-55 (1999); Baselga, J., Norton L., Albanell J., Kim Y.M., Mendelsohn J., Cancer Research, vol. 58, pp. 2825-31 (1998)].

Procedure:

Trastuzumab SPPs were made according to the 20 method of Example 3.

Procedure of Tumor Formation in Nude Mice:

Human breast cancer SK-BR3 or BT-474 cells (American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Virginia, USA)) were cultured in BRMI 1640 medium 25 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine and 1% penicillin G/streptomycin/fungizone solution. After a few cell passages, the human breast cancer cells were inoculated subcutaneously (s.c.) (5 x 10⁷ cells/animal) in the hind thighs of 3-month-old 30 female athymic mice.

Prior to inoculation, mice were primed for 10-14 days with 17 β -estradiol applied subcutaneously in a biodegradable carrier-binder (1.7 mg of estradiol per

WO 03/00014

PCT/US02/19870

131

pellet) to promote growth of the estrogen-dependent breast cancer cells. Tumor nodules were monitored by measuring their dimensions (in mm). Five to six animals were included in each treatment group. The 5 animals were randomly chosen with respect to body weight and tumor nodule size at the start of each treatment. Antibody treatment was initiated when tumors grew to more than 20-30 mm³ in size in one set of animals or to more than 350 mm³ in size in a second set.

10 Recombinant human (rhu) Mab HER-2 antibody (Trastuzumab) SPPs (in suspension) or "non-SPP" crystals (also in suspension) were given subcutaneously at a dose of 10 mg/kg animal body weight in three doses at 4-day intervals (over 12 days). Control injections 15 were of human IgG1 (30 mg/kg), also given subcutaneously, using the same administration protocol. Mice were then sacrificed for pathological examination.

Results:

Both the Trastuzumab SPPs and the Trastuzumab 20 "non-SPP" crystals eradicated most or all of the tumors formed by injecting BT 474 cells into mice, when compared to controls consisting of saline (which was used as the cell delivery vehicle) or non-specific IgG, clearly indicating that the Trastuzumab SPPs are 25 efficacious in mice animal models for human breast cancer. See Figure 6, which shows the results when the efficacy of using Trastuzumab SPPs against human breast cancers in a mouse model was compared to that of Trastuzumab crystals.

30 The animal studies described above are suitable for other antibody SPPs, antibody spherical nanocrystalline composite particles and crystalline antibody SPPs according to this invention, including, *inter alia*, Infliximab and Rituximab.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

132

Example 50 Oligosaccharide profiling of native
(soluble) and dissolved Rituximab
and Trastuzumab

Oligosaccharide profiles were performed to
5 compare the carbohydrate constituents of native,
soluble Rituximab and Trastuzumab with Rituximab and
Trastuzumab obtained from dissolving Rituximab SPPs
(made according to the method of Example 2) and
Trastuzumab SPPs (made according to the method of
10 Example 3). Rituximab and Trastuzumab SPPs were
dissolved according to the method of Example 19.

Procedure:

Oligosaccharide profiling was done by
Capillary Electrophoresis on a Beckman-Coulter P/ACE
15 MDQ instrument, following carbohydrate labeling and
analysis using a Beckman-Coulter E-CAP kit.
Trastuzumab and Rituximab SPPs (from Examples
2 and 3, respectively) were washed, dissolved, and
dialyzed against ddH₂O, and samples of soluble
20 Trastuzumab and Rituximab (as supplied by manufacturer)
were dialyzed against ddH₂O. A 200 µg aliquot of each
sample was reconstituted with 50 mM Phosphate buffer,
pH 7.0. Sodium dodecyl sulfate (SDS), (2-
mercaptoethanol (β -ME), and NP-40 (Tergitol) were added
25 to improve N-linked oligosaccharide cleavage.
Subsequently, PNGase (an enzyme that cleaves
asparagine-linked oligosaccharides) was added to each
sample, and samples were incubated overnight at 37°C.
Protein was then precipitated with 3 volumes of cold
30 ethanol, samples were spun, and the supernatants
(containing oligosaccharides) were recovered and
lyophilized. Oligosaccharide samples were
reconstituted and fluorescently labeled with 1-
aminopyrene-3,6, 8-trisulfonate (APTS) in the presence

WO 03/00014

PCT/US02/19870

133

of NaBH₃CN (sodium cyanoborohydride, a reducing agent which reduces the imine linkage between the labelling reagent and the carbohydrate from reforming after the APTS treatment) at 37°C overnight. The samples were 5 incubated overnight, diluted in water and read with P/ACE MDQ capillary electrophoresis instrument using a laser-induced fluorescence (LIF) detector. The capillary used was a N-CHO coated capillary provided by Beckman-Coulter with the e-CAP carbohydrate analysis 10 kit.

Results:

The results show that the antibodies obtained from dissolving antibody SPPs had the same carbohydrate content as their native, soluble counterparts, 15 demonstrating that the process of forming Rituximab and Trastuzumab SPPs did not alter the carbohydrate content of the native Rituximab and Trastuzumab antibodies. See Figure 15.

Example 51 Rituximab SPPs Viewed Using
20 Transmission Electron Microscopy
 (TEM)

Transmission Electron Microscopy Method:
Samples of Rituximab SPPs, made according to
25 the method of Example 2, were embedded in epoxy resin
and allowed to harden. The Rituximab SPP specimens
were microtomed and placed on Carbon electron
microscopy grids. High magnification TEM images were
obtained using a Phillips CM10 transmission
30 electron microscope operating at 60 kV.

Results:

Electron micrographs showed the layered shell
structure of a Rituximab SPP. The micrographs also

WO 03/00014

PCT/US02/19870

134

exhibited a 4 nm lattice spacing in the crystalline areas of the Rituximab SPPs.

5 Example 52 Rituximab and Trastuzumab SPPs
 Viewed Using Scanning Electron
 Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscopy Method:
Samples of Rituximab or Trastuzumab SPPs, made according to the methods of Examples 2 and 3, respectively, were placed onto freshly prepared carbon-
10 coated gold support grids. Excess buffer was blotted away using filter paper. The solid was coated with Palladium/Gold under vacuum. The coated specimens were analyzed using an ETEC autoscan scanning electron microscope.

15 Example 53 Electron Diffraction of Rituximab
 and Trastuzumab SPPs

Electron diffraction method:
The electron diffraction images were recorded
20 at 640 mm camera length, at 60 Kv and the spot size set at 4.

Results:
The diffraction pattern obtained when an electron beam was focused on Rituximab or Trastuzumab
25 SPPs made according to the methods of Examples 2 and 3, respectively, is indicative of the presence of crystallinity in the region of the SPPs that was analyzed. In contrast, when an electron beam was focused on an amorphous solid consisting of a formvar
30 support polymer on a TEM sample grid, no diffraction

WO 03/00014

PCT/US02/19870

135

pattern was obtained, which is indicative of an amorphous substance.

While we have described a number of embodiments of this invention, it is apparent that our 5 basic examples may be altered to provide other embodiments which utilize the products and processes of this invention. Therefore, it will be appreciated that the scope of this invention is to be defined by the appended claims rather than by the specific embodiments 10 which have been represented by way of example.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

136

CLAIMS

We claim:

1. A spherical protein particle.

2. The spherical protein particle according
5 to claim 1, wherein said spherical protein particle is
a spherical nanocrystalline composite particle.

3. The spherical protein particle according
to claim 1 or 2, wherein said protein is an antibody or
a single-chain Fv fragment of said antibody.

10 4. The spherical protein particle according
to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical
protein particle has a particle size range from about
0.04 microns to about 300 microns in diameter.

15 5. The spherical protein particle according
to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical
protein particle has a particle size range from about
0.04 microns to about 200 microns in diameter.

20 6. The spherical protein particle according
to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical
protein particle has a particle size range from about
0.04 microns to about 100 microns in diameter.

25 7. The spherical protein particle according
to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical
protein particle has a particle size range from about
0.04 microns to about 10 microns in diameter.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

137

8. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle has a particle size range from about 0.04 microns to about 5 microns in diameter.

5 9. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle has a particle size range from about 0.04 microns to about 1 micron in diameter.

10. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle has a particle size range from about 40 nanometers to about 999 nanometers in diameter.

11. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle has a particle size range from about 40 nanometers to about 499 nanometers in diameter.

12. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle has a particle size range greater than about 250 microns to about 300 microns in diameter.

13. The spherical nanocrystalline composite particle according to claim 2, wherein the spherical nanocrystalline composite particle is from about 1 μm to about 300 μm in diameter, and comprises protein nanocrystals having a diameter of about 40 nm to about 999 nm.

14. The spherical nanocrystalline composite

WO 03/000014

PCT/US02/19870

138

particle according to claim 2, wherein the spherical nanocrystalline composite particle is from about 1 μm to about 300 μm in diameter, and comprises protein nanocrystals having a diameter of about 40 nm to about 5 499 nm.

15. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said protein has a conformation which is the same as that of the native, soluble counterpart of the protein, as 10 indicated by an ELISA using a monoclonal antibody which specifically binds the native, soluble counterpart.

16. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said protein has a β -sheet structural content that is less than 15 about 20% different from the β -sheet structural content of the native, soluble counterpart of the protein, and has lost less than about 20% of the α -helical structural content of its native, soluble counterpart, as indicated by FTIR or Circular Dichroism (CD) 20 spectroscopy.

17. The spherical protein particle according to claim 16, wherein said protein has a β -sheet structural content that is less than about 20% 25 different from the β -sheet structural content of the native, soluble counterpart of the protein, as indicated by a correlation spectra as compared to its native, soluble counterpart, as indicated by FTIR.

18. The spherical protein particle 30 according to claim 16, wherein said protein loses less than about 20% of its α -helical structural content

WO 03/00014

PCT/US02/19870

139

after storage for from about 4 days to about 180 days at from about 4 °C to about 50 °C, as compared to its native, soluble counterpart after storage under identical conditions.

5 19. The spherical protein particle according to claim 16, wherein said protein has a β -sheet structural content that is less than about 20% different from the β -sheet structural content of the native, soluble counterpart of the protein, and has
10 lost less than about 20% of the α -helical structural content of the native, soluble counterpart of the protein, as indicated by Circular Dichroism (CD) spectroscopy.

20. The spherical protein particle according
15 to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said protein has a biologically active conformation, as indicated by comparing the biological activity of the protein component of a dissolved spherical protein particle with the biological activity of its native, soluble
20 counterpart.

21. The spherical protein particle according to claim 20, wherein said protein component has about 100% of the biological activity of the native, soluble counterpart of the protein.

25 22. The spherical protein particle according to claim 20, wherein said protein component has about 90% of the biological activity of the native, soluble counterpart of the protein.

23. The spherical protein particle according

WO 03/00014

PCT/US02/19870

140

to claim 20, wherein said protein component has about 80% of the biological activity of the native, soluble counterpart of the protein.

24. The spherical protein particle according
5 to claim 20, wherein said protein component has about 70% of the biological activity of the native, soluble counterpart of the protein.

25. The spherical protein particle according
to claim 20, wherein said protein component has about
10 60% of the biological activity of the native, soluble counterpart of the protein.

26. The spherical protein particle according
to claim 20, wherein said protein component has about
50% of the biological activity of the native, soluble
15 counterpart of the protein.

27. The spherical protein particle according
to claim 3, wherein said antibody or antibody fragment
has greater than about 50% to about 100% of the
biological activity of the native, soluble counterpart
20 of the protein, as determined by a bioimmunoassay.

28. The spherical protein particle according
to claim 27, wherein said bioimmunoassay is a direct
cytotoxicity bioimmunoassay.

29. The spherical protein particle according
25 to claim 27, wherein said bioimmunoassay is a
complement dependent cytotoxicity (CDC) bioimmunoassay.

30. The spherical protein particle according

WO 03/00014

PCT/US02/19870

141

to claim 27, wherein said bioimmunoassay is an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) bioimmunoassay.

31. The spherical protein particle according
5 to claim 3, wherein said antibody is a therapeutic
antibody.

32. The spherical protein particle according
to claim 3, wherein said antibody is selected from the
group consisting of: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, and serum
10 IgA (sIgA) as well as the subclasses IgG1, IgG2, IgG3
and IgG4, IgM1 and IgM2, and IgA1 and IgA2 antibodies.

33. The spherical protein particle according
to claim 3, wherein said antibody has a greater half
life in vivo than the soluble counterpart of said
15 antibody.

34. The spherical protein particle
according to claim 3, wherein said antibody is a
polyclonal antibody or a monoclonal antibody.

35. The spherical protein particle
20 according to claim 3, wherein said antibody is selected
from the group consisting of: Rituximab, Infliximab,
Trastuzumab and Etanercept.

36. The spherical protein particle
according to claim 3, wherein said antibody is selected
25 from the group consisting of: Abciximab, Palivizumab,
Murumonab-CD3, Gemtuzumab, Basiliximab, Daclizumab, and
Zevalin.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

142

37. The spherical protein particle according to claim 3, wherein said antibody is selected from the group consisting of: antibodies for treating cardiovascular disease, antibodies for treating respiratory disease, antibodies for treating tissue transplant rejection, antibodies for treating organ transplant rejection, antibodies for treating cancer, antibodies for treating inflammatory disease and antibodies used in radioimmunotherapy.

10 38. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle is labelled.

15 39. The spherical protein particle according to claim 38, wherein said spherical protein particle is labelled with a label selected from the group consisting of radiolabels, enzyme labels, toxins, magnetic agents and drug conjugates.

20 40. The spherical protein particle according to claim 3, wherein said antibody is selected from the group consisting of anti-TNF antibodies, anti-CD3 antibodies, anti-CD20 antibodies, anti-CD25 antibodies, anti-CD33 antibodies, anti-CD40 antibodies anti-HER2 antibodies, anti-HBV antibodies, anti-HAV antibodies, anti-HCV antibodies, anti-GPIIb/IIIa receptor 25 antibodies, anti-RSV antibodies, anti-HIV antibodies, anti-HSV antibodies and anti-EBV antibodies.

41. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle is a dried spherical protein particle.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

143

42. The spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, wherein said spherical protein particle is a carrier-free pharmaceutical controlled release spherical protein particle.

5 43. The spherical protein particle according to claim 1 or 2, wherein said protein is selected from the group consisting of: enzymes, protein hormones, viruses, viral proteins, antibodies, antibody fragments, receptors and peptides.

10 44. The spherical protein particle according to claim 3, wherein said antibody is selected from the group consisting of: chimeric antibodies, humanized antibodies, non-glycosylated antibodies, bispecific antibodies, human antibodies and mouse antibodies.

15 45. A spherical nucleic acid particle.

46. The spherical nucleic acid particle according to claim 45, wherein said nucleic acid is used for vaccination of a mammal.

20 47. The spherical nucleic acid particle according to claim 45, wherein said nucleic acid is a gene.

48. A composition, said composition comprising:
25 (a) a spherical protein particle according to any one of claims 1, 2 or 3, and
(b) at least one ingredient.

49. The composition according to claim 48,

WO 03/00014

PCT/US02/19870

144

wherein said composition is capable of release of said protein.

50. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
5 particle concentration greater than about 1 mg/ml.

51. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 10 mg/ml.

52. The composition according to claim 48,
10 wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 20 mg/ml.

53. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 50 mg/ml.

15 54. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 100 mg/ml.

55. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
20 particle concentration greater than about 120 mg/ml.

56. The composition according to claim 48,
wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 200 mg/ml.

57. The composition according to claim 48,
25 wherein said composition has a spherical protein
particle concentration greater than about 400 mg/ml.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

145

58. The composition according to claim 48,
wherein said ingredient is a polymeric carrier.

59. The composition according to claim 58,
wherein said polymeric carrier is a biodegradable
5 polymer or a biocompatible polymer.

60. The composition according to claim 58,
wherein said polymeric carrier is a polymer selected
from one or more of the group consisting of: poly
(acrylic acid), poly (cyanoacrylates), poly (amino
10 acids), poly (anhydrides), poly (depsipeptide), poly
(esters), poly (lactic acid), poly (lactic-co-glycolic
acid) or PLGA, poly (β-hydroxybutyrate), poly
(caprolactone), poly (dioxanone); poly (ethylene
glycol), poly (hydroxypropyl)methacrylamide, poly
15 [(organo)phosphazene], poly (ortho esters), poly (vinyl
alcohol), poly (vinylpyrrolidone), maleic anhydride-
alkyl vinyl ether copolymers, pluronic polyols,
albumin, alginate, cellulose and cellulose derivatives,
collagen, fibrin, gelatin, hyaluronic acid,
20 oligosaccharides, glycaminoglycans, sulfated
polysaccharides, blends and copolymers thereof.

61. The composition according to claim 58,
wherein said polymeric carrier is poly(lactic-co-
glycolic acid).

25 62. The composition according to claim 58,
wherein said polymeric carrier is emulsified with
poly(vinyl alcohol).

63. The composition according to claim 58,
wherein said polymeric carrier is a co-polymer.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

146

64. The composition according to claim 48,
wherein said ingredient is albumin.

65. The composition according to claim 48,
5 wherein said protein is an intact antibody or a single-
chain Fv fragment of an antibody.

66. The composition according to claim 48,
wherein said antibody is a therapeutic antibody.

67. The composition according to claim 48,
10 wherein said ingredient is selected from the group
consisting of sucrose, trehalose, lactitol, gelatin,
hydroxypropyl- β -cyclodextrin, methoxypolyethylene
glycol and polyethylene glycol.

68. A method for treating a mammal
15 comprising the step of administering to said mammal an
effective amount of a solution comprising the spherical
protein particle according to any one of claims 1, 2,
or 3, or an effective amount of the composition
according to claim 48.

20 69. The method according to claim 68,
wherein said effective amount is a therapeutically
effective or pharmaceutically effective amount.

70. The method according to claim 68,
25 wherein said effective amount is a diagnostically
effective amount.

71. The method according to claim 68,
wherein said spherical protein particle or said
composition is administered by the route selected from

WO 03/00014

PCT/US02/19870

147

a group consisting of oral, intramuscular, intravenous, pulmonary inhalation, parenteral, transdermal, aerosol delivery, needleless injection, sub-cutaneous injection and needleless sub-cutaneous administration.

5 72. The method according to claim 68,
wherein said solution comprises a suspension of said
spherical protein particle or a suspension of said
composition, wherein the concentration of the protein
in solution is at least about 10 mg/ml.

10 73. The method according to claim 68,
wherein said solution comprises a suspension of said
spherical protein particle or a suspension of said
composition, wherein the concentration of the protein
in solution is at least about 50 mg/ml.

15 74. The method according to claim 68,
wherein said solution comprises a suspension of said
spherical protein particle or a suspension of said
composition, wherein the concentration of the protein
in solution is at least about 100 mg/ml.

20 75. The method according to claim 68,
wherein said solution comprises a suspension of said
spherical protein particle or a suspension of said
composition, wherein the concentration of the protein
in solution is at least about 200 mg/ml.

25 76. The method according to claim 68,
wherein said solution comprises a suspension of said
spherical protein particle or a suspension of said
composition, wherein the concentration of the protein
in solution is at least about 400 mg/ml.

WO 03/000014

PCT/US02/19870

148

77. A method for affinity matrix purification of a protein, comprising the steps of:

- (a) mixing with a binding buffer a spherical protein particle comprising an antibody or antibody fragment according to claim 3 to form a spherical protein particle(buffer mixture, wherein said antibody or antibody fragment has affinity for the protein to be purified;
- (b) adding a protein solution comprising the protein to be purified to the spherical protein particle(buffer mixture to form a protein solution/spherical protein particle(buffer mixture;
- (c) incubating the protein solution/spherical protein particle(buffer mixture for a time and at a temperature sufficient to permit binding of the protein to the antibody or antibody fragment;
- (d) washing the mixture with a wash buffer;

and

- (e) eluting the protein with an elution buffer.

78. A diagnostic kit for the *in vitro* detection of an antigen in a sample, said kit comprising:

- (a) a spherical protein particle comprising an antibody or antibody fragment according to claim 3, wherein said antibody or antibody fragment is capable of specifically binding to said antigen; and
- (b) one or more reagents for detecting the binding of said antibody or antibody fragment to any antigen in said sample.

79. The diagnostic kit according to claim 78, wherein said antigen is a viral antigen.

149

80. The diagnostic kit according to
claim 79, wherein said viral antigen is selected from
the group consisting of: HIV-1 antigens, HIV-2
antigens, Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) antigens,
5 Hepatitis B Virus (HBV) antigens, Hepatitis C Virus
(HCV) antigens, Influenza Virus antigens, Herpes
Simplex Virus Type-1 (HSV-1) antigens, Herpes Simplex
Virus Type-2 (HSV-2) antigens, Epstein-Barr Virus (EBV)
antigens, Varicella-Zoster Virus antigens, Cytomegalo
10 Virus (CMV) antigens, Rhinovirus antigens, Adenovirus
antigens, Human Papillomavirus (HPV) antigens,
Poliovirus antigens, Coxsackie Virus antigens and Foot-
And-Mouth Disease Virus (FMDV) antigens.

81. The diagnostic kit according to claim
15 78, wherein said antibody or said antibody fragment is
labelled.

82. An *in vitro* diagnostic method for
detecting the presence of an antigen in a sample
comprising the steps of:
20 (a) contacting said sample with a
spherical protein particle comprising an antibody or
antibody fragment according to claim 3, wherein said
antibody or antibody fragment is capable of
specifically binding to said antigen, under conditions
25 which permit said antibody or antibody fragment to bind
to any antigen in said sample; and
(b) detecting the binding of said antibody
or antibody fragment to any antigen in said sample.

83. The diagnostic method according to claim
30 82, wherein said antigen is a viral antigen.

WO 03/00014

PCT/US02/19870

150

84. The diagnostic method according to claim 83, wherein said viral antigen is selected from the wherein said viral antigen is selected from the group consisting of: HIV-1 antigens, HIV-2 antigens, Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) antigens, Hepatitis B Virus (HBV) antigens, Hepatitis C Virus (HCV) antigens, Influenza Virus antigens, Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) antigens, Herpes Simplex Virus Type-2 (HSV-2) antigens, Epstein-Barr Virus (EBV) antigens, Varicella-Zoster Virus antigens, Cytomegalo Virus (CMV) antigens, Rhinovirus antigens, Adenovirus antigens, Human Papillomavirus (HPV) antigens, Poliovirus antigens, Coxsackie Virus antigens and Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) antigens.

15 85. The diagnostic method according to claim 82, wherein said antibody or said antibody fragment is labelled.

86. A diagnostic kit for the *in vitro* detection of an antibody in a sample, said kit comprising:
20 (a) a spherical protein particle according to claim 1 or 2, wherein said protein is an antigen capable of specifically binding to said antibody; and
(b) one or more reagents for detecting
25 the binding of said antigen to any antibody in said sample.

87. The diagnostic kit according to claim 86, wherein said antibody is an antibody which specifically binds to a viral antigen.

30 88. The diagnostic kit according to claim

WO 03/00014

PCT/US02/19870

151

87, wherein said viral antigen is selected from the
wherein said viral antigen is selected from the group
consisting of: HIV-1 antigens, HIV-2 antigens, Human T-
cell Leukemia Virus (HTLV) antigens, Hepatitis B Virus
5 (HBV) antigens, Hepatitis C Virus (HCV) antigens,
Influenza Virus antigens, Herpes Simplex Virus Type-1
(HSV-1) antigens, Herpes Simplex Virus Type-2 (HSV-2)
antigens, Epstein-Barr Virus (EBV) antigens, Varicella-
zoster Virus antigens, Cytomegalovirus (CMV) antigens,
10 Rhinovirus antigens, Adenovirus antigens, Human
Papillomavirus (HPV) antigens,
Poliovirus antigens, Coxsackie Virus antigens and Foot-
And-Mouth Disease Virus (FMDV) antigens.

89. The diagnostic kit according to claim
15 86, wherein said antigen is labelled.

90. An *in vitro* diagnostic method for
detecting the presence of an antibody in a sample
comprising the steps of:
(a) contacting said sample with a
20 spherical protein particle according to claim 1 or 2,
wherein said protein is an antigen capable of
specifically binding to said antibody, under conditions
which permit said antigen to bind to any antibody in
said sample; and
25 (b) detecting the binding of said antigen
to any antibody in said sample.

91. The diagnostic method according to claim
90, wherein said antibody is an antibody which
specifically binds to a viral antigen.

30 92. The diagnostic method according to claim

WO 03/00014

PCT/US02/19870

152

91, wherein said viral antigen is selected from the group consisting of: HIV-1 antigens, HIV-2 antigens, Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) antigens, Hepatitis B Virus (HBV) antigens, Hepatitis C Virus (HCV) antigens, Influenza Virus antigens, Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) antigens, Herpes Simplex Virus Type-2 (HSV-2) antigens, Epstein-Barr Virus (EBV) antigens, Varicella-Zoster Virus antigens, Cytomegalovirus (CMV) antigens, Rhinovirus antigens, Adenovirus antigens, Human Papillomavirus (HPV) antigens, Poliovirus antigens, Coxsackie Virus antigens and Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) antigens.

93. The diagnostic method according to claim 90, wherein said antigen is labelled.

15 94. An *in vivo* diagnostic method for detecting the presence of an antigen in a mammal comprising the steps of:

20 (a) administering to said mammal a diagnostically effective amount of a spherical protein particle comprising an antibody or antibody fragment according to claim 3, wherein said antibody or antibody fragment is capable of specifically binding to said antigen, under conditions which permit said antibody or antibody fragment to bind to any antigen in said sample; and

25 (b) detecting the binding of said antibody or antibody fragment to any antigen in said sample.

95. The diagnostic method according to claim 94, wherein said antibody or said antibody fragment is labelled.

WO 03/00014

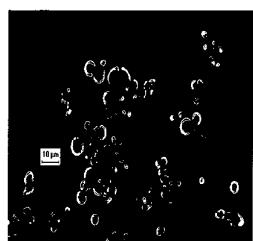
PCT/US02/19870

153

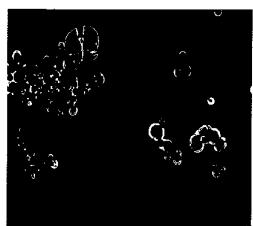
96. An *in vivo* diagnostic method for detecting the presence of an antibody in a sample comprising the steps of:
- (a) administering to said mammal a 5 diagnostically effective amount of a spherical protein particle according to any of claims 1 or 2, wherein said protein is an antigen capable of specifically binding to said antibody, under conditions which permit said antigen to bind to any antibody in said sample;
- 10 and
- (b) detecting the binding of said antigen to any antibody in said sample.

97. The diagnostic method according to claim 96, wherein said antigen is labelled.

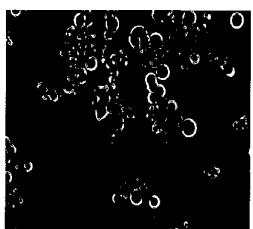
**FIGURE 1: MORPHOLOGY OF MONOCLONAL
ANTIBODY SPPs**



A. Infliximab (RemicadeTM) SPPs



B. Rituximab (RituxanTM) SPPs



C. Trastuzumab (HerceptinTM) SPPs

FIGURE 2: FTIR ANALYSIS OF TRASTUZUMAB SPPs
AND NATIVE, SOLUBLE TRASTUZUMAB

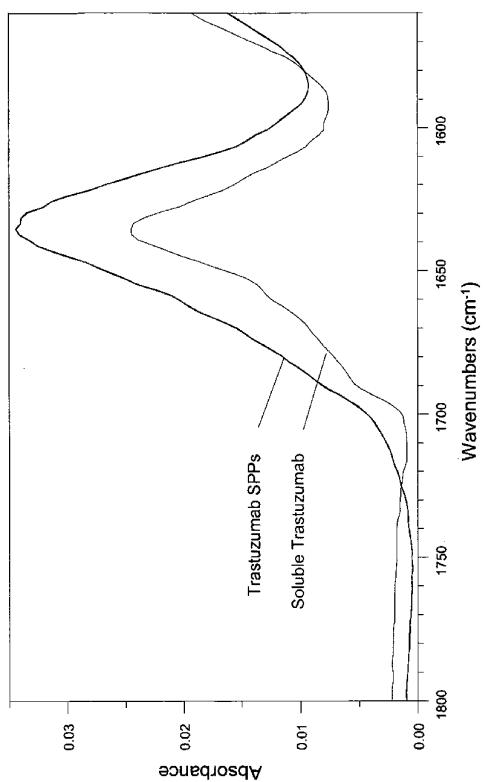


FIGURE 3: FTIR ANALYSIS OF INFILIXIMAB SPPs
AND NATIVE, SOLUBLE INFILIXIMAB

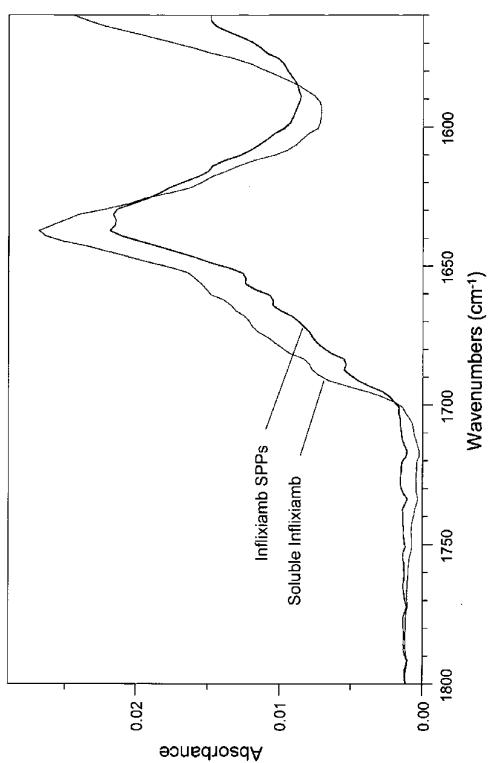


FIGURE 4: FTIR ANALYSIS OF RITUXIMAB SPPs
AND NATIVE, SOLUBLE RITUXIMAB

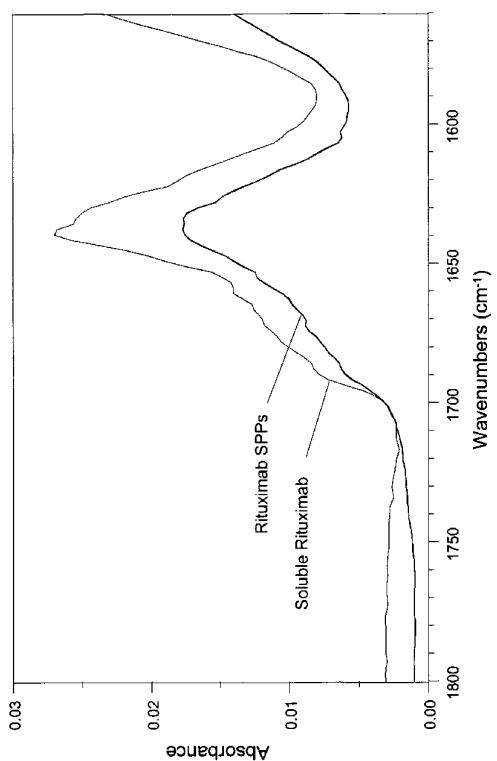


FIGURE 5

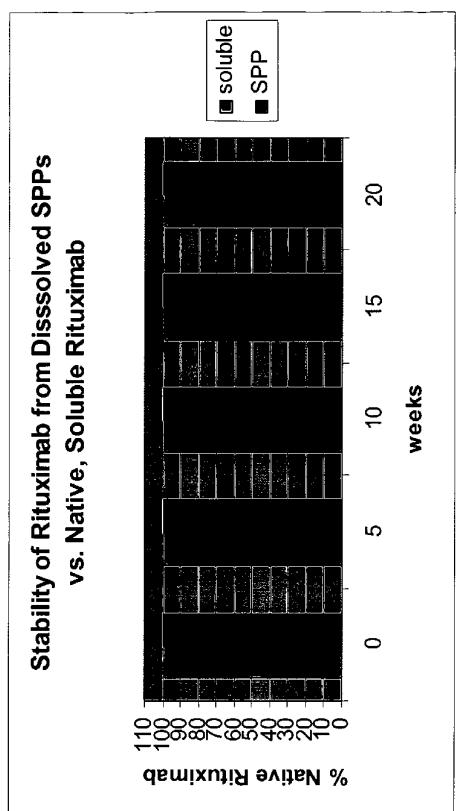


FIGURE 6

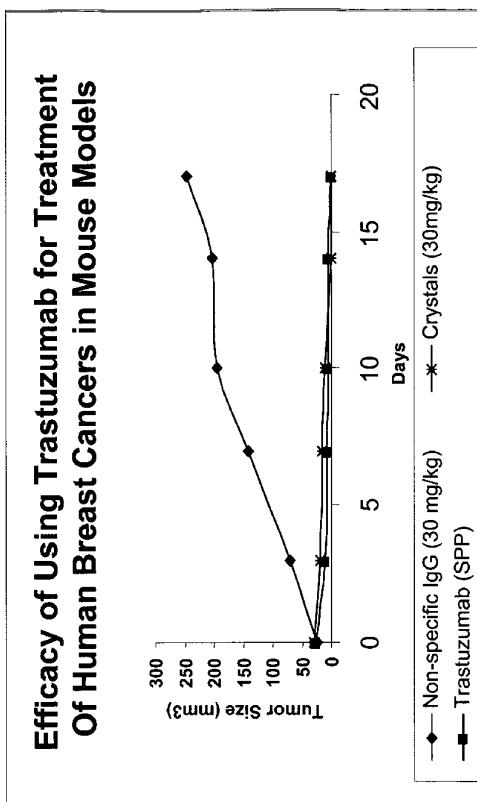


FIGURE 7: Comparison of the Stability of Dissolved Rituximab and Trastuzumab SPPs with the Stability of Native, Soluble Rituximab and Trastuzumab

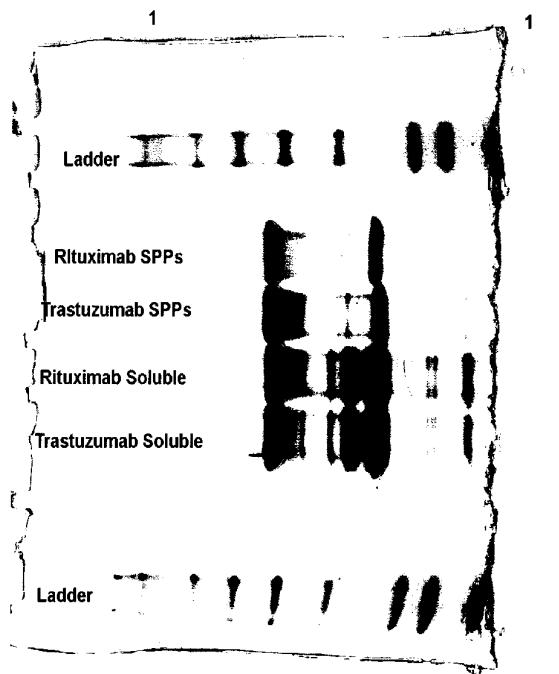


Figure 8: Selective fractionation/purification of Infliximab (Remicade™), Rituximab (Rituxan™) and Trastuzumab (Herceptin™) from milk proteins by preparation of SPPs

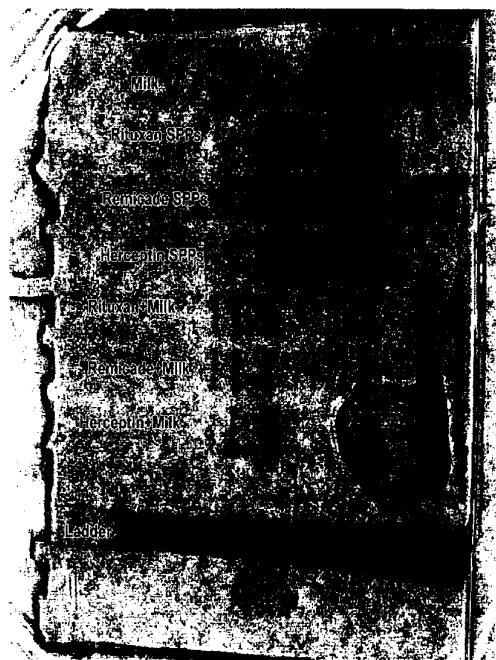


Figure 9: Rituximab SPP-Induced Direct Cytotoxicity

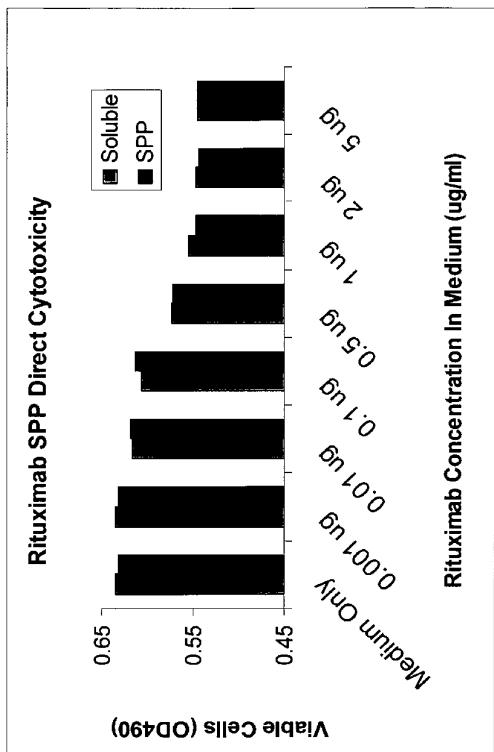
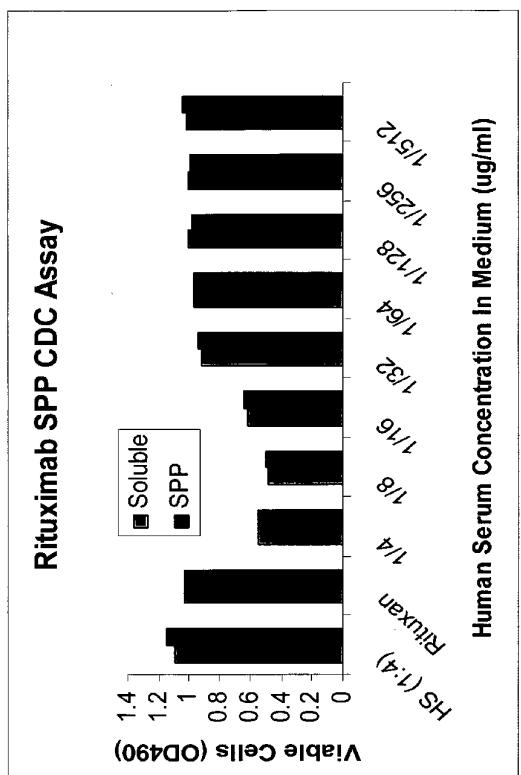


Figure 10: Rituximab SPP-Induced Complement Dependent Cytotoxicity

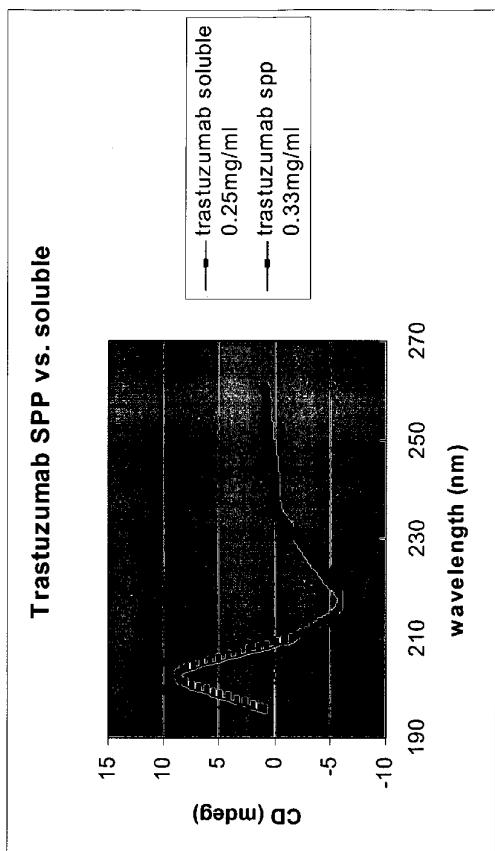


WO 03/000014

11/16

PCT/US02/19870

Figure 11: Circular Dichroism (CD) Spectra of Trastuzumab SPPs Compared to Native, Soluble Trastuzumab

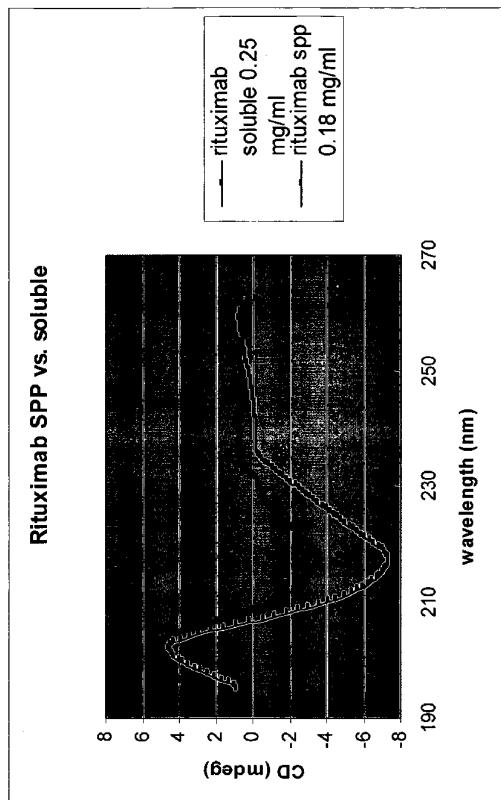


WO 03/000014

12/16

PCT/US02/19870

Figure 12: Circular Dichroism (CD) Spectra of Rituximab SPPs Compared to Native, Soluble Rituximab



WO 03/000014

13/16

PCT/US02/19870

Figure 13: Circular Dichroism (CD) Spectra of Infliximab SPPs Compared to Native, Soluble Infliximab

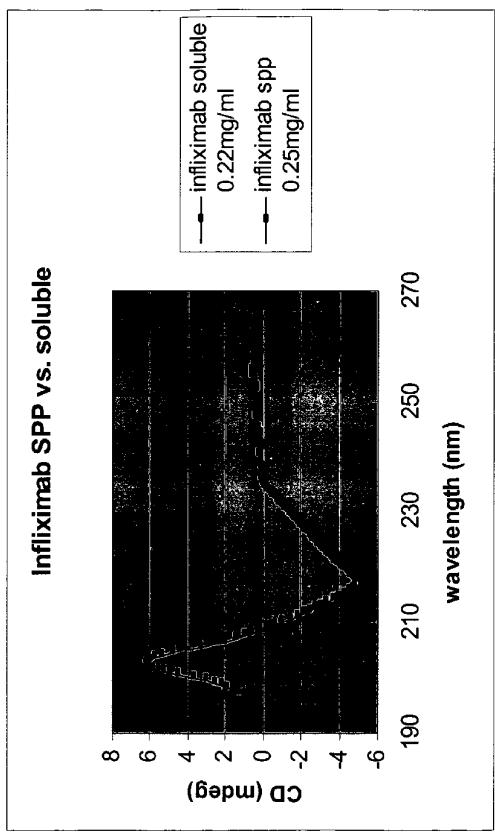
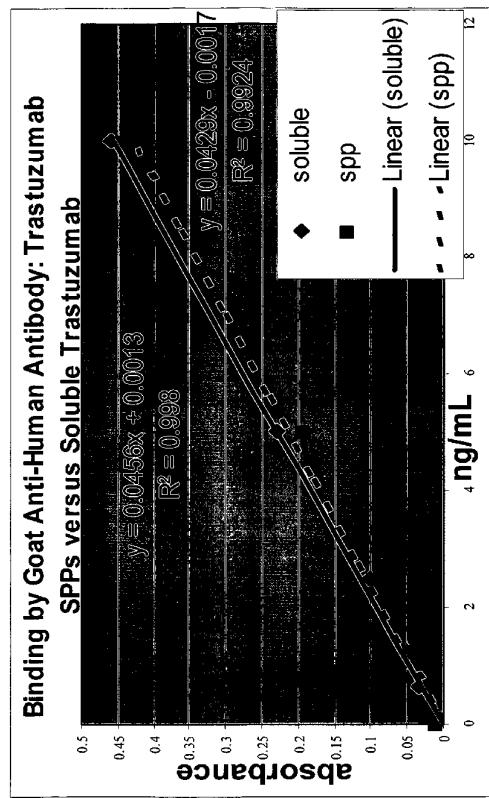


Figure 14: ELISA to Measure the Ability of Trastuzumab Obtained from Dissolving SPPs and Native, Soluble Trastuzumab to Bind Anti-Human Antibodies



WO 03/000014

15/16

PCT/US02/19870

Figure 15: Profiles Comparing the Carbohydrate Constituents of RituXimab (top profile) and Trastuzumab (bottom profile) Obtained from Dissolving SPPs with their Native, Soluble Counterparts

Herceptin and Rituxan Oligosaccharide Profiles

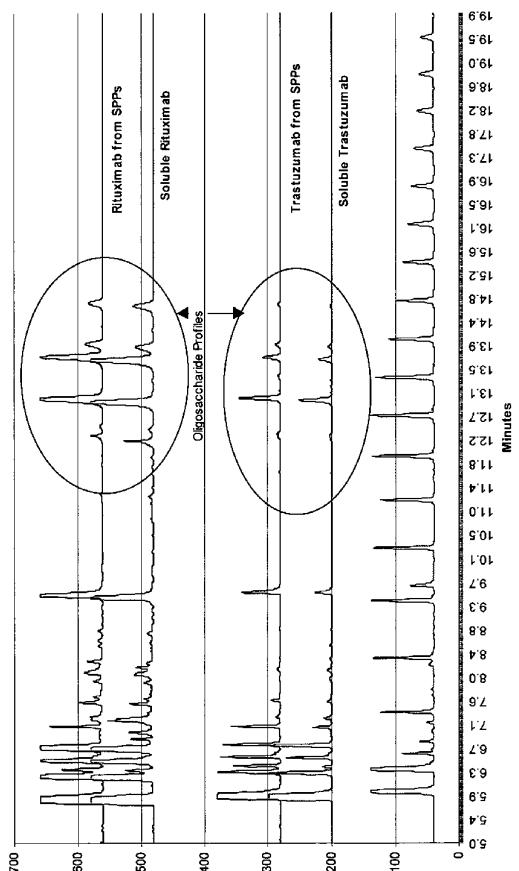
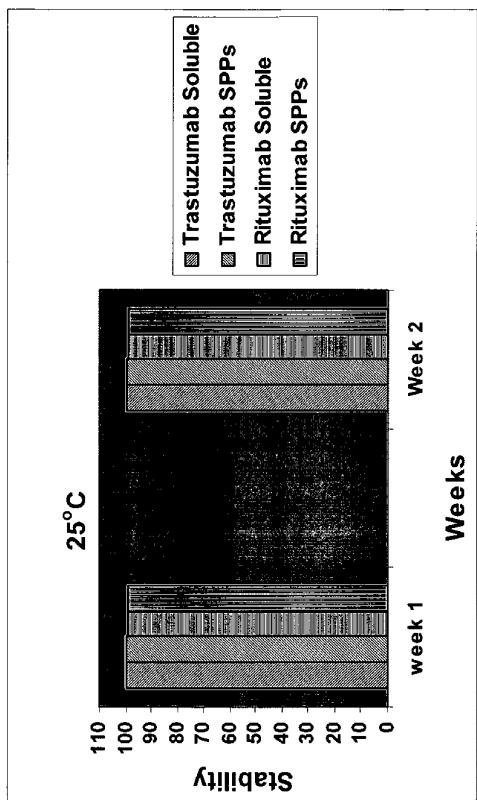


Figure 16: Stability of Rituximab and Trastuzumab SPPs



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 1/14	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 1/14	
C 0 7 K 16/24	C 0 7 K 16/08	
C 0 7 K 16/26	C 0 7 K 16/24	
G 0 1 N 33/53	C 0 7 K 16/26	
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/577	B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

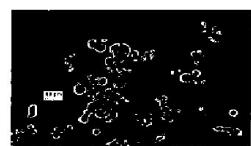
(72)発明者 ヤコフレフスキイ , キリル アメリカ合衆国 マサチューセツツ 0 2 4 6 8 , ワーバン , パイン リッジ ロード 9 1
(72)発明者 チャマクキネ , ミカエル アメリカ合衆国 マサチューセツツ 0 2 1 7 3 , ケンブリッジ , ピーボディ テラス 2 7
(72)発明者 カラフ , ネイザー アメリカ合衆国 マサチューセツツ 0 2 4 5 8 , ウォースター , ラウフ ストリート 1 4
(72)発明者 ゴヴァーダン , チャンドリカ ピー . アメリカ合衆国 マサチューセツツ 0 2 1 7 3 , レキシントン , スコットランド ロード 9
(72)発明者 ジュン , チュ ダブリュー . アメリカ合衆国 マサチューセツツ 0 2 4 7 6 , アーリントン , クーリッジ ロード 2 1
F ターム(参考) 4C084 AA13 NA14 ZA401 ZA591 ZB081 ZB111 ZB261 4C085 AA13 AA14 BA68 BA69 BA87 BB07 BB22 CC22 HH20 JJ02 KA03 4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74 GA40

专利名称(译)	球状蛋白质颗粒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	JP2005500304A	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003506470	申请日	2002-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	阿尔特斯生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿尔特斯生物制品有限公司		
[标]发明人	ヤコフレフスキーキリル チャマクキネミカエル カラフネイザー ゴヴァーダンチャンドリカピー ジュンチュダブリュー		
发明人	ヤコフレフスキー, キリル チャマクキネ, ミカエル カラフ, ネイザー ゴヴァーダン, チャンドリカ ピー. ジュン, チュ ダブリュー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K9/16 A61K9/51 A61K9/52 A61K9/54 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61M5/307 A61P9/10 A61P11/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/14 C07K16/08 C07K16/18 C07K16/24 C07K16/26 C12P21/08 G01N33/577		
CPC分类号	A61K9/1688 A61K9/5146 A61K39/39591 A61P11/00 A61P29/00 B82Y5/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K16/241 C07K16/2887 C07K16/32 C07K2317/732 C07K2317/734 C30B7/06 C30B29/58 C30B29 /60 Y02A50/466 Y10S977/904 Y10T428/2982		
FI分类号	C07K16/18 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K49/00.A A61P9/10 A61P11/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/14 C07K16/08 C07K16/24 C07K16/26 G01N33/53.D G01N33/577.B		
F-TERM分类号	4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA401 4C084/ZA591 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA68 4C085/BA69 4C085/BA87 4C085/BB07 4C085/BB22 4C085 /CC22 4C085/HH20 4C085/JJ02 4C085/KA03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA40		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/299989 2001-06-21 US		
其他公开文献	JP2005500304A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含生物活性蛋白质，SPP，球形纳米晶体复合颗粒或晶体SPP或这样的SPP，球形纳米晶体复合颗粒或晶体SPP的组合物（包括制剂）。更具体地，单独使用或用于干燥的组合物用于或浆料组合物使用时，生物活性蛋白质是高浓度的，SPP，球形纳米晶体复合颗粒或结晶的SPP，生产方法，以及稳定的SPP，球形纳米晶体复合颗粒或结晶的SPP在催化剂存在下。本发明还涉及使用SPP，球形纳米晶复合颗粒或结晶SPP来稳定，储存和递送生物活性蛋白的方法。本发明进一步提供用于生物医学应用，SPP，使用球形纳米晶体复合物颗粒或晶体或SPP含有它们的制剂或组合物的方法。

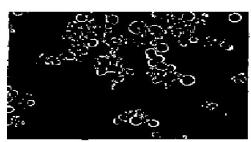
**MORPHOLOGY OF MONOCLONAL
ANTIBODY SPPs**



A. Infliximab (RemicadeTM) SPPs



B. Rituximab (RituxanTM) SPPs



C. Trastuzumab (HerceptinTM) SPPs