



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102988984 A

(43) 申请公布日 2013.03.27

(21) 申请号 201210563488.X

(22) 申请日 2012.12.21

(71) 申请人 嘉和生物药业有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区哈雷路 1043 号 602 室

(72) 发明人 周新华 李晓辉 尚玉栓

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限
公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61K 9/08(2006.01)

A61K 47/34(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

A61P 17/06(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

增强稳定性的抗 TNF- α 人单克隆抗体的含
水药物制剂

(57) 摘要

本发明提供一种新的抗 TNF- α 人单克隆抗
体的液体含水药物制剂,其以山梨醇稳定抗体溶
液以及调节渗透压;以磷酸氢二钠/一合柠檬酸
或乙酸钠/乙酸为缓冲剂,优选为磷酸氢二钠/一
合柠檬酸;以吐温-20 为表面活性剂,使抗体制剂
更加稳定,保存时间更长;同时简化了制剂成分,
使制剂的配制更加简单方便。

1. 一种液体含水药物制剂,包括:

- (a) 抗 TNF- α 人单克隆抗体;
- (b) 多元醇;
- (c) 缓冲剂;
- (d) 表面活性剂;
- (e) 氯化钠;
- (f) 水;

其中,所述多元醇为山梨醇;所述缓冲剂为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸或乙酸钠/乙酸;所述表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯。

2. 权利要求 1 的液体含水药物制剂,其中所述抗 TNF- α 人单克隆抗体为 D2E7 单克隆抗体,其浓度为 10-80g/L,优选 20-70g/L,特别优选 50g/L。

3. 权利要求 1 的液体含水药物制剂,其中所述山梨醇的浓度为 10-20g/L,优选 12-18g/L,最优选 15g/L。

4. 权利要求 1 的液体含水药物制剂,其中所述聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯的浓度为 0.01-3g/L,优选 1g/L。

5. 权利要求 1 的液体含水药物制剂,其中所述缓冲剂为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸,pH 为 5-6,优选 pH 5.0-5.4,更优选 pH 5.2,其 pH5.2 的缓冲溶液的摩尔浓度范围为 10-40mM,优选 21.5mM,即磷酸氢二钠 2g/L,一水合柠檬酸 1.54g/L,并以氢氧化钠调节最终制剂 pH 5.2。

6. 权利要求 1 的液体含水药物制剂,其中所述缓冲剂为乙酸钠/乙酸,pH 为 5-6,优选 pH 5.0-5.4,更优选 pH 5.2,其 pH 5.2 缓冲溶液的摩尔浓度范围为 10-40mM,优选 18.5mM,即乙酸钠 1.23g/L,乙酸 0.2mL/L,并以乙酸调节最终制剂 pH 5.2。

7. 权利要求 1-6 任一项的液体含水药物制剂,其中所述氯化钠的浓度为 2-14g/L,优选 3-12g/L,最优选 6.16g/L。

8. 权利要求 7 的液体含水药物制剂,其中所述抗 TNF- α 人单克隆抗体为 D2E7 单克隆抗体,浓度为 10-80g/L,优选 20-70g/L,特别优选 50g/L;所述山梨醇的浓度为 10-20g/L,优选 12-18g/L,最优选 15g/L;所述表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯,浓度为 0.01-3g/L,优选 1g/L;所述缓冲剂为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸或乙酸钠/乙酸,优选磷酸氢二钠/一水合柠檬酸为缓冲剂,所述含水药物制剂的 pH 为 5-6,优选 pH 5.0-5.4,更优选 pH 5.2。

9. 权利要求 8 的液体含水药物制剂,其为以下物质的水溶液:

成分	浓度 (mg/mL)
D2E7 单克隆抗体	50.0
磷酸氢二钠	2.0
一水合柠檬酸	1.54
山梨醇	15.0
氯化钠	6.16
吐温-20	1.0

10. 权利要求 8 的液体含水药物制剂,其为以下物质的水溶液:

成分	浓度
D2E7 单克隆抗体	50 .0mg/mL
乙酸钠	1.23 mg/mL
乙酸	0.2 mL/L
山梨醇	15 .0mg/mL
氯化钠	6.16 mg/mL
吐温-20	1.0 mg/mL

增强稳定性的抗 TNF- α 人单克隆抗体的含水药物制剂

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及增强稳定性的全人单克隆抗体药物的液体含水药物制剂;涉及应用本发明的液体含水药物制剂治疗相关疾病的用途。

背景技术

[0002] 人肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 已被证实与多种疾病相关,如类风湿关节炎、银屑病等自身免疫性疾病。多个抗 TNF- α 药物已被美国 FDA 批准用于治疗 TNF- α 相关的自身免疫性疾病,如阿达木单抗 (Adalimumab, 商品名 Humira, 雅培公司)。

[0003] 应用于临床治疗的阿达木单抗为液体注射制剂,内包材为预充式注射器。其制剂处方包含氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸、柠檬酸钠、甘露醇、失水山梨醇聚氧乙烯醚单油酸酯 (Tween 80)、注射用水 (Humira 说明书)。虽然该制剂存在稳定性,但仍不足以长时间稳定抗体,预计成品不宜更长时间放置。这可能是由于该制剂所使用的抗氧化剂及渗透压调节剂——甘露醇不能发挥优良的稳定作用。此外,现有的阿达木单抗使用的表面活性剂为吐温 -80,虽然其可抑制和 / 或阻止蛋白分子在水与空气界面、内包材接触面上的聚合、吸附等不良结果从而稳定抗体,但是其自身也会在一定程度上发生不饱和键氧化和酯键水解从而产生酸、醛、过氧化氢,从而影响了抗体的稳定性。同时,其处方缓冲溶液成分冗余复杂,不仅增加了产品成本,而且使制剂的配制操作繁琐。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题,本发明提供一种新的抗 TNF- α 人单克隆抗体的液体含水药物制剂,使抗体制剂更加稳定,保存时间更长;同时简化了制剂成分,使制剂的配制更加简单方便。

[0005] 本发明提供的含水药物制剂包括:

[0006] (a) 抗 TNF- α 人单克隆抗体;

[0007] (b) 多元醇;

[0008] (c) 缓冲剂;

[0009] (d) 表面活性剂;

[0010] (e) 氯化钠;

[0011] (f) 水;

[0012] 其中,所述多元醇为山梨醇;所述缓冲剂为磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸或乙酸钠 / 乙酸,优选磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸;所述表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯 (吐温 -20)。

[0013] 本发明的液体含水药物制剂的 pH 为 4-8,电导为 8-18mS/cm,渗透压为 250-400mOsm/kg。

[0014] 本发明的液体含水药物制剂,其包括 10-80g/L 重组抗 TNF- α 人单克隆抗体、10-20g/L 山梨醇、0.01-3g/L 吐温 -20、2-14g/L 氯化钠,以及磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸的

缓冲剂,其 pH 为 4-8,优选 pH 5-6,更优选 pH 5.0-5.4。

[0015] 本发明的液体含水药物制剂,其包括 10-80g/L 重组抗 TNF- α 人单克隆抗体、10-20g/L 山梨醇、0.01-3g/L 吐温-20、2-14g/L 氯化钠,以及乙酸钠 / 乙酸的缓冲剂,其 pH 为 4-8,优选 pH 5-6,更优选 pH 5.0-5.4。

具体实施方式

[0016] 为了便于理解本发明,对本发明的某些术语进行定义:

[0017] 术语“药物制剂”表示其形式使得活性成分的生物学活性明确有效,并且它不包括对施用所述制剂的受试者明显有毒的其它成分。

[0018] “稳定的”制剂为制剂在保存时,其中的抗体基本上能保持它的物理稳定性和 / 或化学稳定性和 / 或生物稳定性。

[0019] “缓冲溶液”:当往某些溶液中加入一定量的酸和碱时,有阻碍溶液 pH 变化的作用,称为缓冲作用,这样的溶液叫做缓冲溶液。

[0020] “缓冲剂”:能使溶液 pH 值在一定范围内维持基本恒定的物质。

[0021] 在本发明的范围内,抗体的“治疗有效量”或“有效量”表示在预防或治疗疾病方面的有效量,对于所述疾病的治疗来说,所述抗体是有效的。

[0022] 术语“人 TNF- α ”表示人细胞因子,它是以 17kD 的分泌形式和 26kD 膜缔合形式存在的,生物学活性形式包括共价结合的 17kD 分子的三聚体。其具体结构见于 Pennica, D., 等 (1984)Nature 312 :724-729 ;Davis, J. M., 等 (1987)Biochemistry26 :1322-1326 ;和 Jones, E. Y., 等 (1989)Nature 338 :225-228。

[0023] 术语“重组人抗体”意在包括重组方法制备、表达、生产或分离的人抗体。

[0024] 原液:不含吐温的含水药物制剂。

[0025] 成品:按量加入吐温的含水药物制剂。

[0026] SEC-HPLC:分子排阻高效液相色谱法。

[0027] CEX-HPLC(Acidic、Main、Basic):阳离子交换 - 高效液相色谱法(酸性峰、主峰、碱性峰)。

[0028] NR-CE-SDS:非还原毛细管电泳法。

[0029] Potency:生物学活性。

[0030] 本发明提供含水药物制剂,包括:

[0031] (a) 抗 TNF- α 人单克隆抗体;

[0032] (b) 多元醇;

[0033] (c) 缓冲剂;

[0034] (d) 表面活性剂;

[0035] (e) 氯化钠;

[0036] (f) 水;

[0037] 其中,所述多元醇为山梨醇;所述缓冲剂为磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸或乙酸钠 / 乙酸,优选磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸;所述表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温-20)。

[0038] 本发明的液体含水药物制剂的 pH 为 4-8,电导为 8-18mS/cm,渗透压为

250-400mOsm/kg。

[0039] 本发明的含水药物制剂,含有治疗有效量的重组抗 TNF- α 人单克隆抗体,其浓度为 10-80g/L,优选 20-70g/L,特别优选 50g/L。

[0040] 已知多元醇能起到抗氧化作用,因此可以稳定抗体。本发明使用山梨醇,浓度为 10-20g/L,优选 12-18g/L,最优选 15g/L,本发明的实施例中,采用山梨醇较现有阿达木单抗制剂中使用甘露醇能更好的稳定抗体。

[0041] 本发明的含水药物制剂 pH 为 4-8,优选 5-6,特别优选 5.2。本发明的缓冲剂磷酸氢二钠/一水合柠檬酸或乙酸钠/乙酸,优选为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸,其 pH 5.2 的缓冲溶液的摩尔浓度范围为 10-40mM,优选 21.5mM,即磷酸氢二钠 2g/L,一水合柠檬酸 1.54g/L,并以氢氧化钠调节最终制剂 pH 5.2。使用该缓冲剂可配制出与原有的阿达木单抗制剂中每个离子相同浓度的缓冲溶液,保证磷酸根、柠檬酸根、钠离子变化均在 5%以内,简化了制剂配制过程,节约了成本。本发明的一个实施例中的缓冲剂为乙酸钠/乙酸,其 pH 5.2 缓冲溶液的摩尔浓度范围为 10-40mM,优选 18.5mM,即乙酸钠 1.23g/L,乙酸 0.2mL/L,并以乙酸调节最终制剂 pH 5.2。

[0042] 聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯(吐温)对抗体聚合起到抑制作用,本发明使用不饱和键较少的吐温-20(聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯)以减少自身氧化从而降低对抗体稳定性的不利影响。在实施例中,采用吐温-20 较原来的阿达木单抗制剂采用吐温-80(聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯)能使药物制剂有更好的稳定性。特别地,在一个稳定性(光照实验)实施例中,使用磷酸氢二钠/一水合柠檬酸的缓冲剂时,吐温-20 能显著提高药物制剂的稳定性。可选的吐温-20 浓度为 0.01-3g/L,优选 1g/L。

[0043] 氯化钠为渗透压调节剂,本发明的实施方案中,其浓度为 2-14g/L,优选 3-12g/L,最优选 6.16g/L。

[0044] 本发明的液体含水药物制剂的缓冲溶液为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸溶液, pH 4-8,优选 pH 5-6,更优选 pH 5.0-5.4,电导为 8-18mS/cm,优选 11.1-14.1mS/cm,渗透压为 250-400mOsm/kg,优选 280-360mOsm/kg。

[0045] 本发明的液体含水药物制剂的缓冲溶液为乙酸钠/乙酸溶液, pH 为 4-8,优选 pH 5-6,更优选 pH 5.0-5.4,电导为 8-18mS/cm,优选 9.6-13.0mS/cm,渗透压为 250-400mOsm/kg,优选 270-350mOsm/kg。

[0046] 本发明提供一种新的抗 TNF- α 人单克隆抗体的液体含水药物制剂,使抗体制剂更加稳定,保存时间更长;同时简化了制剂成分,使制剂的配制更加简单方便。

[0047] 以下参照实施例详细描述本发明,应理解,下述实施例意在说明,不对本发明构成限制。

[0048] 本发明使用的抗 TNF- α 人单克隆抗体为嘉和生物药业有限公司制备的 IgG1 重组抗体 D2E7(参见中国专利 ZL97193635.8);水为嘉和生物药业有限公司自产注射用水;山梨醇购自河北省石家庄瑞雪制药有限公司,其符合中国药典药用级;其它试剂均购自 J. T. Baker 公司,其符合美国药典药用级。

[0049] 以下为本发明所使用的仪器型号:天平:Sartorius TE4101;pH 和电导率一体仪:METTLER TOLEDO SevenMulti;渗透压测定仪:Model3250smometer(ADVANCED INSTRUMENTS, INC.);HPLC:Waters2695-2487,其中,SEC-HPLC 所用分析柱为 Tosoh TSKgel

G3000SW ;CEX-HPLC 所用分析柱为 Tosoh TSKgel CM-STAT ;NR-CE-SDS 测定所用仪器为 Beckman PA800plus。

[0050] 实施例 1. 缓冲溶液的制备

[0051] 1.1 制备 8L 磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸超滤缓冲溶液 (超滤缓冲溶液 A)

[0052] 分别称取 16g 磷酸氢二钠、12.32g 一水合柠檬酸、120g 山梨醇、49.28g 氯化钠,以注射用水加至 7.9L,待完全溶解、混合均匀后用 1M 氢氧化钠调节 pH 5.2,定容至 8.0L 备用。

[0053] 1.2 制备 8L 磷酸氢二钠 / 磷酸二氢钠和柠檬酸钠 / 柠檬酸超滤缓冲溶液 (超滤缓冲溶液 B)

[0054] 分别称取 6.88g 二水合磷酸二氢钠、12.24g 二水合磷酸氢二钠、2.4g 柠檬酸钠、10.4g 一水合柠檬酸、96g 甘露醇、49.28g 氯化钠,以注射用水加至 7.9L,待完全溶解、混合均匀后用 1M 氢氧化钠调节 pH 5.2,定容至 8.0L 备用。

[0055] 1.3 制备 8L 乙酸钠 / 乙酸超滤缓冲溶液 (超滤缓冲溶液 C)

[0056] 分别称取 9.84g 乙酸钠、120g 山梨醇、49.28g 氯化钠,注射用水加至 7.9L,待完全溶解、混合均匀后用乙酸调节 pH 5.2,定容至 8.0L 备用。

[0057] 实施例 2. 抗体浓度为 51g/L 的超滤浓缩液的制备

[0058] 2.1 缓冲溶液为磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸溶液的超滤浓缩液的制备 (超滤浓缩液 A)

[0059] 超滤仪 VIVA Flow 200 (厂家 Sartorius) 按厂家推荐步骤用 0.2M 氢氧化钠清洗,包括清洗超滤膜、超滤杯、管道、出口等,再用 0.5L 实施例 1.1 中的超滤缓冲溶液 A 清洗以除去氢氧化钠。将 0.48L 抗 TNF- α 人单克隆抗体溶液 (抗体浓度 25g/L,总抗体 12g) 加入超滤杯中,以超滤缓冲溶液 A 开始等体积换液,换液体积为 4.8L。换液完毕后,将抗体溶液自 0.48L 浓缩至约 0.2L,去极化后回收抗体溶液,经测定回收的抗体溶液体积为 0.204L,浓度为 52g/L (符合体积约 0.2L、浓度大于 51g/L 要求)。加入 4mL 超滤缓冲溶液 A 将回收后的抗体溶液稀释至 51g/L,用无菌无热源的 0.22 μ m 无菌过滤膜过滤,所获得过滤溶液无菌保存。

[0060] 2.2 缓冲溶液为磷酸氢二钠 / 磷酸二氢钠和柠檬酸钠 / 柠檬酸溶液的超滤浓缩液的制备 (超滤浓缩液 B)

[0061] 超滤仪 VIVA Flow 200 基本操作同实施例 2.1 中所述,再用 0.5L 实施例 1.2 中的超滤缓冲溶液 B 清洗以除去氢氧化钠。将 0.48L 抗 TNF- α 人单克隆抗体溶液 (抗体浓度 25g/L,总抗体 12g) 加入超滤杯中,以超滤缓冲溶液 B 开始等体积换液,换液体积为 4.8L。换液完毕后,将抗体溶液自 0.48L 浓缩至约 0.2L,去极化后回收抗体溶液,经测定回收的抗体溶液体积为 0.209L,浓度为 52g/L (符合体积约 0.2L、浓度大于 51g/L 要求)。加入 4mL 超滤缓冲溶液 B 将回收后的抗体溶液稀释至 51g/L,用无菌无热源的 0.22 μ m 无菌过滤膜过滤,所获得过滤溶液无菌保存。

[0062] 2.3 缓冲溶液为乙酸钠 / 乙酸溶液的超滤浓缩液的制备 (超滤浓缩液 C)

[0063] 超滤仪 VIVA Flow 200 基本操作同实施例 2.1 中所述,再用 0.5L 实施例 1.3 中的超滤缓冲溶液 C 清洗以除去氢氧化钠。将 0.48L 抗 TNF- α 人单克隆抗体溶液 (抗体浓度 25g/L,总抗体 12g) 加入超滤杯中,以超滤缓冲溶液 C 开始等体积换液,换液体积为 4.8L。

换液完毕后,将抗体溶液自 0.48L 浓缩至约 0.2L,去极化后回收抗体溶液,经测定回收的抗体溶液体积为 0.195L,浓度为 54g/L(符合体积约 0.2L、浓度大于 51g/L 要求)。加入 11mL 超滤缓冲溶液 C 将回收后的抗体溶液稀释至 51g/L,用无菌无热源的 0.22 μm 无菌过滤膜过滤,所获得过滤溶液无菌保存。

[0064] 实施例 3. 原液的配制

[0065] 3.1 制备 0.9mL/西林瓶原液 A(缓冲溶液为磷酸氢二钠/一水合柠檬酸,不含吐温的制剂)

[0066] 无菌条件下,取 50mL 实施例 2.1 的超滤浓缩液 A,加入用无菌无热源的 0.22 μm 无菌过滤膜过滤的 1mL 实施例 1.1 的超滤缓冲溶液 A,充分混合均匀,即为原液 A。无菌条件下,将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中,装量 0.9mL/瓶,分装 54 支,加塞扎盖后 2-8℃ 避光保存待用。

[0067] 每支情况说明:每支装量 0.9mL,标示量 0.8mL,其组成如下:

	原液 A 成分	浓度 (mg/mL)
[0068]	D2E7 单克隆抗体	50.0
	磷酸氢二钠	2.0
	一水合柠檬酸	1.54
	山梨醇	15.0
	氯化钠	6.16

[0069] 3.2 制备 0.9mL/西林瓶原液 B(缓冲溶液为磷酸氢二钠/磷酸二氢钠和柠檬酸钠/柠檬酸溶液,不含吐温 -80 的制剂)

[0070] 无菌条件下,取 50mL 实施例 2.2 的超滤浓缩液 B,加入用无菌无热源的 0.22 μm 无菌过滤膜过滤的 1mL 实施例 1.2 的超滤缓冲溶液 B,充分混合均匀,即为原液 B。无菌条件下,将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中,装量 0.9mL/瓶,分装 54 支,加塞扎盖后 2-8℃ 避光保存待用。

[0071] 每支情况说明:每支装量 0.9mL,标示量 0.8mL,其组成如下:

	原液 B 成分	浓度 (mg/mL)
[0072]	D2E7 单克隆抗体	50.0
	二水合磷酸二氢钠	0.86
	二水合磷酸氢二钠	1.53
	柠檬酸钠	0.3
	一水合柠檬酸	1.3
	甘露醇	12.0
	氯化钠	6.16

[0073] 3.3 制备 0.9mL/西林瓶原液 C(缓冲溶液为乙酸钠/乙酸溶液,不含吐温的制剂)

[0074] 无菌条件下,取 50mL 实施例 2.3 的超滤浓缩液 C,加入用无菌无热源的 0.22 μm 无菌过滤膜过滤的 1mL 实施例 1.3 的超滤缓冲溶液 C,充分混合均匀,即为原液 C。无菌条件下,将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中,装量 0.9mL/瓶,分装 54 支,加塞扎盖后 2-8℃ 避光保存待用。

[0075] 每支情况说明：每支装量 0.9mL，标示量 0.8mL，其组成如下：

	原液 C 成分	浓度
	D2E7 单克隆抗体	50.0mg/mL
[0076]	乙酸钠	1.23 mg/mL
	乙酸	0.2 mL/L
	山梨醇	15.0mg/mL
	氯化钠	6.16 mg/mL

[0077] 实施例 4. 成品的制备

[0078] 4.1 制备 0.9mL/西林瓶成品 A(缓冲溶液为磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸，含吐温 -20 的制剂)

[0079] 称取 1.00g 吐温 -20，以注射用水定容于 19.6mL，用无菌无热源的 0.22 μ m 无菌过滤膜过滤，取过滤后的第 10-19mL 无菌保存备用，即为 51× 吐温 20 母液。

[0080] 无菌条件下，取 50mL 实施例 2.1 的超滤浓缩液 A，加入 1mL 51× 吐温 20 母液，充分混合均匀，即为成品 A。无菌条件下，将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中，装量 0.9mL/瓶，分装 54 支，加塞扎盖后 2-8℃ 避光保存待用。

[0081] 每支情况说明：每支装量 0.9mL，标示量 0.8mL，其组成如下：

	成品 A 成分	浓度 (mg/mL)
	D2E7 单克隆抗体	50.0
	磷酸氢二钠	2.0
[0082]	一水合柠檬酸	1.54
	山梨醇	15.0
	氯化钠	6.16
	吐温 20	1.0

[0083] 4.2 制备 0.9mL/西林瓶成品 B(缓冲溶液为磷酸氢二钠 / 磷酸二氢钠和柠檬酸钠 / 柠檬酸溶液，含吐温 -80 的制剂)

[0084] 称取 1.00g 吐温 80，以注射用水定容于 19.6mL，用无菌无热源的 0.22 μ m 无菌过滤膜过滤，取过滤后的第 10-19mL 无菌保存备用，即为 51× 吐温 -80 母液。

[0085] 无菌条件下，取 50mL 实施例 2.2 的超滤浓缩液 B，加入 1mL 51× 吐温 -80 母液，充分混合均匀，即为成品 B。无菌条件下，将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中，装量 0.9mL/瓶，分装 54 支，加塞扎盖后 2-8℃ 避光保存待用。

[0086] 每支情况说明：每支装量 0.9mL，标示量 0.8mL，其组成如下：

	成品 B 成分	浓度 (mg/mL)
	D2E7 单克隆抗体	50.0
	二水合磷酸二氢钠	0.86
	二水合磷酸氢二钠	1.53
[0087]	柠檬酸钠	0.3
	一水合柠檬酸	1.3
	甘露醇	12.0
	氯化钠	6.16
	吐温 80	1.0

[0088] 4.3 制备 0.9mL/西林瓶成品 C(缓冲溶液为乙酸钠/乙酸溶液,含吐温-20 的制剂)

[0089] 无菌条件下,取 50mL 实施例 2.3 的超滤浓缩液 C,加入 1mL 实施例 4.1 中制得的 51×吐温-20 母液,充分混合均匀,即为成品 C。无菌条件下,将其分装于 2mL 无菌无热源的液体注射剂西林瓶中,装量 0.9mL/瓶,分装 54 支,加塞扎盖后 2-8℃避光保存待用。

[0090] 每支情况说明:每支装量 0.9mL,标示量 0.8mL,其组成如下:

	成品 C 成分	浓度
	D2E7 单克隆抗体	50.0mg/mL
	乙酸钠	1.23 mg/mL
[0091]	乙酸	0.2 mL/L
	山梨醇	15.0mg/mL
	氯化钠	6.16 mg/mL
	吐温 20	1.0 mg/mL

[0092] 实施例 5. 稳定性考察

[0093] 5.15±3℃长期稳定性实验和 25±2℃加速实验

[0094] 分别取上述实施例中的 0.9mL/西林瓶原液 A、B、C 及成品 A、B、C 各 12 支,将其置于 5±3℃的 Scientific Revco 冷藏冰箱内,预计分别于第 0 天、第 5 天、第 15 天、第 30 天、第 3 个月、第 6 个月取样分析,每种样品每个取样点放 2 支;分别取上述实施例中的 0.9mL/西林瓶原液 A、B、C 及成品 A、B、C 各 12 支,将其置于 25±2℃的 Climacell 222 恒温恒湿培养箱中,分别于第 0 天、第 5 天、第 15 天、第 30 天、第 3 个月、第 6 个月取样分析,每种样品每个取样点放 2 支。分析方法为取样后立即肉眼检测外观,再进行 SEC-HPLC、CEX-HPLC、NR-CE-SDS 和生物学活性的检测。上述实验设计中,如果第 30 天、第 6 个月的结果符合预期,则不必分析第 15 天、第 3 个月的取样点。实验结果见表 1 至表 7。

[0095] 表 1. 第 0 天检测结果

检测项目		第 0 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SEC-HPLC (%)		99.2	99.1	99.2	99.2	99.2	99.2
[0096] CEX-HPLC	%Acidic	30.7	30.8	31.0	31.0	31.1	31.1
	% Main	58.6	58.4	58.5	58.5	58.3	58.5
	% Basic	10.6	10.7	10.6	10.6	10.5	10.4
NR-CE-SDS	%IgG	97.0	97.0	97.0	96.7	96.7	96.6
Potency (%)		95	98	96	109	104	103

[0097] 表 2.5±3℃,第 5 天长期稳定性实验结果

检测项目		5±3℃, 第 5 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
[0098] SEC-HPLC (%)		99.2	99.1	99.2	99.2	99.2	99.2
[0098] CEX-HPLC	%Acidic	30.7	30.8	31.0	31.0	31.1	31.1
	% Main	58.6	58.4	58.5	58.5	58.3	58.5
	% Basic	10.6	10.7	10.6	10.6	10.5	10.4
[0099] NR-CE-SDS	%IgG	97.0	97.0	97.0	96.7	96.7	96.6
Potency (%)		95	98	96	109	104	103

[0100] 表 3.5±3℃,第 30 天长期稳定性实验结果

检测项目		5±3℃, 第 30 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
[0101] SEC-HPLC (%)		99.1	99.1	99.1	99.2	99.1	99.1
[0101] CEX-HPLC	%Acidic	30.6	30.6	31.0	30.8	31.0	31.1
	% Main	58.5	58.6	58.4	58.5	58.3	58.4
	% Basic	10.9	10.8	10.6	10.7	10.7	10.5
NR-CE-SDS	%IgG	96.9	97.0	97.1	96.7	96.6	96.8
Potency (%)		105	101	99	104	111	114

[0102] 表 4.5±3℃,第 6 个月长期稳定性实验结果

检测项目		5±3℃, 第 6 个月					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SE-HPLC (%)		99	99.1	99	99	99	99
[0103] CEX-HPLC	% Acidic	30.7	31	30.9	30.9	31.1	31
	% Main	58.2	58	58.2	58.2	58.1	58.3
	% Basic	11.1	11.1	10.9	10.9	10.7	10.7
NR-CE-SDS	%IgG	97	96.9	96.9	96.8	96.6	96.6
Potency (%)		102	108	104	115	115	112

[0104] 表 5. 25±2℃, 第 5 天加速实验结果

检测项目		25±2℃, 第 5 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
[0105] SEC-HPLC (%)		99.1	99.1	99	99.1	99.1	99
[0105] CEX-HPLC	%Acidic	30.7	31	30.9	30.9	31.1	31
	%Main	58.2	58	58.2	58.2	58.1	58.3
	% Basic	11.1	11.1	10.9	10.9	10.7	10.7
[0106] NR-CE-SDS	%IgG	97	96.9	96.9	96.8	96.6	96.6
Potency (%)		102	108	104	115	115	112

[0107] 表 6. 25±2℃, 第 30 天加速实验结果

检测项目		25±2℃, 第 30 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
[0108] SEC-HPLC (%)		99	99.1	99	99	99	99
[0108] CEX-HPLC	%Acidic	30.6	30.5	30.8	31	30.8	30.9
	%Main	58.5	58.5	58.3	58.2	58.5	58.4
	% Basic	10.9	11	10.9	10.8	10.7	10.7
NR-CE-SDS	%IgG	96.9	96.9	96.7	97	96.8	96.6
Potency (%)		106	115	99	103	102	113

[0109] 表 7. 25±2℃, 第 6 个月加速实验结果

检测项目		25±2℃, 第 6 个月					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SEC-HPLC (%)		96.8	98.2	95.9	97.2	96.1	97.3
[0110] CEX-HPLC	%Acidic	40.9	31.2	46.9	39.8	45.7	38.5
	%Main	47.2	57.7	41.1	48.5	42.5	49.9
	% Basic	11.9	11.1	12	11.7	11.8	11.6
NR-CE-SDS	%IgG	95	95.9	94.7	95.1	94.5	95.3
Potency (%)		111	103	104	114	110	117

[0111] 实验结果显示,在 5±3℃组中,原液 A、B、C 和成品 A、B、C 在第 5 天、第 30 天、第 6 个月所有检测结果均与第 0 天无明显差异,使用缓冲剂磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸和吐温 -20 以及使用缓冲剂乙酸钠 / 乙酸和吐温 -20 可以达到与阿达木单克隆抗体液体注射剂相同的稳定性。

[0112] 在 25±2℃组中,原液 A、B、C 和成品 A、B、C 在第 5 天、第 30 天的所有检测结果均与第 0 天无明显差异,但第 6 个月的检测结果显示有差异(如表 7 所示):通过比较发现,成品 A 的 SEC-HPLC 纯度比成品 B、C 高约 1% 且主峰向酸性峰的变化比成品 B、C 的小约 7-8%,这说明成品 A 好于成品 B 和 C,进一步,成品 A、B、C 的 SEC-HPLC 纯度分别高于其原液 A、B、C 的纯度约 1%,且相应发生更少的主峰向酸性峰的变化,说明吐温有明显稳定抗体的作用,特别是防止抗体分子的聚合;通过对比 3 个原液组发现本实施例中所用的缓冲剂磷酸氢二钠 / 一水合柠檬酸比缓冲剂乙酸钠 / 乙酸对抗体有更好的稳定作用,所用的山梨醇比甘露醇对抗体有更好的稳定作用。

[0113] 5.2 光照实验

[0114] 分别取上述实施例中的 0.9mL/西林瓶原液 A、B、C 及成品 A、B、C 各 8 支,用铝箔包裹避光,然后将其置于 40±2℃的 Climacell 404 恒温恒湿培养箱中,分别于第 0 天、第 5 天、第 15 天、第 30 天对每种样品分别取样两支进行分析;分别取上述实施例中的 0.9mL/西林瓶原液 A、B、C 及成品 A、B、C 各 8 支,将其置于 40±2℃、光照(强度 4000-5000lx)的 Climacell 404 恒温恒湿培养箱中,分别于第 0 天、第 5 天、第 15 天、第 30 天对每种样品分别取样两支进行分析。分析方法为取样后立即肉眼检测外观,再进行 SEC-HPLC、CEX-HPLC、NR-CE-SDS 和生物学活性的检测。上述实验设计中,如果第 30 天的结果符合预期,则不必分析第 15 天的取样点。实验结果见表 8 至表 10。

[0115] 表 8. 40±2℃, 避光 5 天影响因素实验结果

[0116]

检测项目		40 ± 2℃, 避光, 第 5 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SEC-HPLC (%)		99	99	98.6	98.6	99	99
CEX-HPLC	% Acidic	31.5	31.3	33.3	33.4	31.3	31.5
	% Main	58.0	57.8	55.2	55.1	57.6	57.9
	% Basic	10.5	10.9	11.5	11.4	11.1	10.6
NR-CE-SDS	%IgG	96.8	96.9	96.3	96.1	96.7	96.9
Potency (%)		95	90	93	100	105	116

[0117] 表 9. 40 ± 2℃, 避光 30 天影响因素实验结果

[0118]

检测项目		40 ± 2℃, 避光, 第 30 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SEC-HPLC (%)		97.0	97.2	95.5	95.1	96.4	97.0
CEX-HPLC	% Acidic	39.4	39.1	47.1	47.1	41.6	41.1
	% Main	49.0	49.3	41.2	41.5	46.7	47.2
	% Basic	11.6	11.6	11.7	11.4	11.7	11.7
NR-CE-SDS	%IgG	94.9	95.1	93.1	93.1	94.5	94.7
Potency (%)		102	95	102	107	118	108

[0119] 表 10. 40 ± 2℃, 光照 5 天影响因素实验结果

[0120]

测试项目		40 ± 2℃, 光照, 第 5 天					
		原液 A	成品 A	原液 B	成品 B	原液 C	成品 C
SEC-HPLC (%)		76.8	79.8	66.0	66.7	74.9	66.5
CEX-HPLC	% Acidic	N/A ^a	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	% Main						
	% Basic						
NR-CE-SDS	%IgG	65.8	70.5	58.1	58.1	65.4	59.3
Potency (%)		36%	51%	31%	34%	32%	32%

[0121] aCEX 检测项下, 峰形产生右移, 无法准确积分, 故数据未列出。

[0122] 1) 在 40 ± 2℃ 避光组中, 原液 A、B、C 和成品 A、B、C 在第 5 天、第 30 天外观均未见异常。随着时间延长, SEC-HPLC 和 NR-CE-SDS 纯度均有所下降, 但原液 A、C 和成品 A、C 纯度下降幅度小于原液 B 和成品 B, 说明原液 A、C 和成品 A、C 好于原液 B 和成品 B, 推测可能是更高浓度的山梨醇比甘露醇对抗体分子有更好的保护作用。同时, 随着时间的延长, 各个样品中的抗体的主峰峰面积不断减少, 酸性峰峰面积不断增加, 且部分主峰转变成酸性峰。相同时间内, 主峰转变成酸性峰越多, 说明抗体本身变化越多, 越不稳定, 进一步对比 6 个样品可发现成品 A、C 和原液 A、C 中由主峰向酸性峰的增加小于成品 B 和原液 B 中由主峰向

酸性峰的增加,说明成品 A、C 和原液 A、C 比成品 B 和原液 B 更利于抗体的稳定。整个实验周期中,生物学活性未检测到下降。

[0123] 2) $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 光照 (强度 4000-5000lx) 组在第 5 天外观可见颗粒状物质, SEC-HPLC 和 NR-CE-SDS 纯度均大幅下降,幅度约 20-35%, CEX-HPLC 无法检出,生物学活性急剧下降失去分析意义。在第 10 天外观可见明显液固分离现象,因此第 15 天、30 天考察样品已经没有分析的意义。

[0124] 结论:

[0125] 各个原液、成品的 SEC-HPLC 和 NR-CE-SDS 纯度显示从优到劣顺序如表 11 所示:

[0126] 表 11. $40 \pm 2^\circ\text{C}$ 光照影响因素实验结果

[0127]

纯度检测项目	6 个原液、成品从优到劣排序
SEC-HPLC	成品 A >> 原液 A > 原液 C >>> 成品 C = 成品 B = 原液 B
NR-CE-SDS	成品 A >> 原液 A = 原液 C >>> 成品 C > 成品 B = 原液 B

[0128] 注: >>> 表示明显好于,前者纯度较后者高 5%; >> 表示好于,前者纯度较后者高 2-5%; > 表示略好于,前者纯度较后者高 1-2%; = 表示等同于,两者纯度相差 $\pm 1\%$ 以内。

[0129] 从表 11 可以得出本发明提供的液体注射制剂——缓冲剂为磷酸氢二钠-柠檬酸或乙酸钠/乙酸,且表面活性剂为吐温-20——在稳定性方面优于现有的阿达木单抗液体注射制剂,优选缓冲系统为磷酸氢二钠-柠檬酸且表面活性剂为吐温-20 的液体注射制剂,其稳定性显著优于现有的阿达木单抗液体注射制剂。