



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101378773 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 13

(21) 申请号 200680053051. 4

(22) 申请日 2006. 12. 19

(30) 优先权数据

60/752, 150 2005. 12. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 08. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/062297 2006. 12. 19

(87) PCT申请的公布数据

W02007/076354 EN 2007. 07. 05

(73) 专利权人 布里斯托尔—迈尔斯斯奎布公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 M·M·达利 C·E·达尔黑姆

S·波尔萨迪亚 V·H·纳林格雷卡

R·B·甘地 M·内鲁尔卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘冬 黄可峻

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1191490 A, 1998. 08. 26,

WO 2004091658 A1, 2004. 10. 28,

CN 1477968 A, 2004. 02. 25,

审查员 潘天耀

权利要求书 1 页 说明书 45 页

序列表 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

稳定蛋白质制剂

(57) 摘要

本发明总体上涉及含有 CTLA4Ig 分子的稳定制剂, 包括经各种途径(例如静脉(IV)和皮下(SC))给药用于治疗免疫系统疾病和耐受诱导的低压冻干和液体制剂。

1. 含有以下物质的稳定制剂:125mg/ml 量的 SEQ ID NO:2 所示的起于 27 位的甲硫氨酸或 26 位的丙氨酸,止于 383 位的赖氨酸或 382 位的甘氨酸的 CTLA4Ig 分子;170mg/ml 量的蔗糖;至少一种缓冲剂;和无菌注射用水,其中所述制剂的 pH 范围为 6-8。

2. 权利要求 1 的制剂,其中缓冲剂为至少 10mM 量的磷酸钠,其中磷酸钠为其二氢盐和一氢盐的混合物。

3. 权利要求 1 的制剂,其进一步包含表面活性剂,其中表面活性剂为 8mg/ml 量的帕洛沙姆 188。

4. 权利要求 1 的制剂,其中制剂于 2-8℃ 保存至少 12 个月是稳定的。

5. 含有以下物质的稳定制剂:20mg/ml 量的 SEQ ID NO:2 所示的起于 27 位的甲硫氨酸或 26 位的丙氨酸,止于 383 位的赖氨酸或 382 位的甘氨酸的 CTLA4Ig 分子;40mg/ml 量的蔗糖;缓冲剂,为至少 10mM 量的磷酸钠;和无菌注射用水,其中所述制剂的 pH 范围为 6-8。

6. 权利要求 5 的制剂,其进一步包含表面活性剂,其中表面活性剂为 8mg/ml 量的帕洛沙姆 188。

7. 权利要求 5 的制剂,其中制剂于 2-8℃ 保存至少 12 个月是稳定的。

稳定蛋白质制剂

[0001] 本发明申请要求 2005 年 12 月 20 日申请的美国序列号 60/752150 的优先权,其因此以其整体并于本文以作参考。

[0002] 本文所引用的所有专利、专利申请和出版物均已其整体并于本文以作参考。这些出版物的公开内容以其整体并于本申请作为参考以更详尽地描述本技术现状,如至本文中本发明描述和要求之日本领域技术人员已知。

发明领域

[0003] 本发明大体上涉及含有 CTLA4Ig 分子的稳定制剂,包括用于各种给药途径(包括例如静脉内(IV)和皮下(SC))的低压冻干和液体制剂。

发明背景

[0004] 在过去 20 年中,重组 DNA 技术使许多蛋白质疗法商业化。蛋白质药物最常规的给药途径为静脉内(IV)给药,这是由于绝大多数其它给药途径的生物利用度低、临床给药时需要更多的监控以及更快速的药物研发。对于需要频繁和长期给药的产品而言,另一种皮下(SC)给药途径更具有吸引力。当与预充式注射器和自动注射器技术联合使用时,SC 给药允许家庭给药并提高了给药的顺应性。

[0005] 使用高于 1mg/kg 或 100mg/剂量的高剂量治疗时需要研发浓度超过 100mg/ml 的制剂,这是由于小体积(< 1.5ml)才可以通过 SC 途径给药。对于在更高浓度容易聚集的蛋白质而言,达到这样高浓度的制剂是一种研发挑战。甚至对于可以大体积给药的 IV 给药途径而言,高剂量给药方案可能需要几十 mg/ml 的蛋白浓度,而这一浓度会影响一些蛋白质的稳定性。

[0006] 控制蛋白质溶解度的原理比小合成分子的更复杂,因此克服蛋白质的溶解度问题需要不同的策略。在操作上,蛋白质的溶解度可描述为在辅溶质存在下并因此溶液保持澄清(例如,没有蛋白质沉淀、结晶或凝胶)时蛋白质的最大量。蛋白质的溶解度对离子强度、盐形式、pH、温度和某些赋形剂的依赖性可由重力水(bulkwater)表面张力的变化和蛋白质与水及离子的结合与自身结合的对比进行机械学解释,见 Arakawa 等, Theory of protein solubility(蛋白质溶解度原理), Methods of Enzymology, 114:49-77, 1985; Schein Solubility as a function of protein structure and solvent components(溶解度作为蛋白质结构和溶剂组分的函数), BioTechnology 8(4):308-317, 1990; Jenkins Three solutions of the protein solubility problem(蛋白质溶解度问题的三种解答), Protein Science 7(2):376-382, 1998; 及其它。蛋白质与某些赋形剂或盐的结合可通过蛋白质构象的变化或遮盖参与自身结合的某些氨基酸影响溶解度。蛋白质也会优先被某些盐、氨基酸和糖水化(并稳定化形成更紧致的构象),导致其溶解度变化。

[0007] 聚集需要两分子之间的碰撞,是蛋白质溶液中的主要降解途径。浓度与形成聚集的关系取决于聚集物的大小和结合机制。蛋白质聚集可引起共价(例如二硫键连接)或非共价(可逆或不可逆)结合。由非共价结合引起的不可逆聚集通常经由可改变蛋白质天然

构象的由温度、机械或化学过程暴露的疏水区域发生。蛋白质聚集可影响蛋白质活性、药物代谢动力学和安全性,例如由于免疫原性。

[0008] 最小化聚集作用的典型方法为限制蛋白质的移动性以降低碰撞次数。用适当的赋形剂低压冻干可防止聚集提高蛋白质的稳定性,其方式为降低蛋白质的移动性和限制构象的柔性,其另外的益处为由于去除水分使水解反应降至最低。加入适当的赋形剂,包括冻干保护剂,可防止在冻干和终产品的保存过程中发生聚集。有效保护的关键参数为冻干保护剂与蛋白质的摩尔比值。通常要求 300 : 1 或更高的摩尔比值以提供适当的稳定性,尤其是对于室温保存。然而这些比值也可引起不利的粘度增加。

[0009] 低压冻干可设计具有适当稳定性和张力的制剂。虽然 SC 给药并不一定要求等渗性,但对于降低给药时的疼痛还是有需要的。亲液物的等渗性较难达到,这是由于在重新溶解的过程中蛋白质和赋形剂都被浓缩。如果终蛋白浓度的目标 > 100mg/ml, 500 : 1 的赋形剂与蛋白质的摩尔比将得到高渗制剂。如果要得到等渗制剂,那么各种可供选择的较低的赋形剂与蛋白质摩尔比将可能得到较不稳定的制剂。

[0010] 确定可达到的最高蛋白质浓度仍然取决于经验,这是由于蛋白质构象的易变性和其与自身、与表面和特定溶质相互作用的倾向性。

[0011] 可从 SC 制剂中获益的受试者实例为其病症需要频繁或长期给药的患者,例如患有免疫系统疾病、类风湿性关节炎和与移植物移植相关的免疫紊乱的受试者。可购买的用于治疗类风湿性关节炎的蛋白质产品包括 HUMIRA[®], ENBREL[®] 和 REMICADE[®]。

[0012] HUMIRA[®] (Abbott) 的包装为一次性、1ml 的预充式玻璃注射器作为无菌的、不含防腐剂的溶液用于皮下给药。HUMIRA[®] 溶液澄清、无色, pH 约为 5.2。每一支注射器可释放 0.8ml (40mg) 的药品。每 0.8ml HUMIRA[®] 含有 40mg 阿达木单抗、4.93mg 氯化钠、0.69mg 二水合磷酸二氢钠、1.22mg 二水合磷酸氢二钠、0.24mg 柠檬酸钠、1.04mg 一水合柠檬酸、9.6mg 甘露醇、0.8mg 聚山梨酯 80 和注射用水 USP。必要时加入氢氧化钠调节 pH。

[0013] ENBREL[®] (Amgen) 的包装为一次性、1ml 的预充式注射器作为无菌的、不含防腐剂的溶液用于皮下给药。ENBREL[®] 溶液澄清、无色, pH 为 6.3±0.2。每一支 ENBREL[®] 一次性预充式注射器含有 0.98ml 的 50mg/ml 依那西普溶液,其中含 10mg/ml 蔗糖、5.8mg/ml 氯化钠、5.3mg/ml L-精氨酸盐酸盐、2.6mg/ml 一水合磷酸二氢钠和 0.9mg/ml 无水磷酸氢二钠。如果将管形瓶重新溶解并按照建议给药,给药一支 50mg/ml 的 ENBREL[®] 预充式注射器相当于 2 支 25mg 的 ENBREL[®] 冻干管形瓶。ENBREL[®] 多次使用管形瓶含有无菌、白色、不含防腐剂的冻干粉末。用 1ml 所提供的抑菌性注射用水 (BWFI), USP (含有 0.9% 苯甲醇) 可都得到多次使用、澄清、无色溶液, pH 为 7.4±0.3, 含有 25mg 依那西普、40mg 甘露醇、10mg 蔗糖和 1.2mg 氨丁三醇。

[0014] REMICADE[®] (Centocor) 为用于静脉输注的无菌、白色、冻干粉末。在用 10ml 无菌注射用水 USP 重新溶解后,所得 pH 接近 7.2。每一支一次性管形瓶含有 100mg 英夫利昔单抗、500mg 蔗糖、0.5mg 聚山梨酯 80、2.2mg 一水合磷酸二氢钠和 6.1mg 二水合磷酸二氢钠。不添加防腐剂。

[0015] 可购买的用于治疗与移植物移植相关的免疫紊乱的蛋白质产品包括 SIMULECT[®] 和 ZENAPAX[®]。

[0016] 药品 SIMULECT[®] (Novartis) 为无色冻干物,其包装为 6ml 无色玻璃管形瓶,含量

为 10mg 和 20mg。每一支 10-mg 管形瓶含有 10mg 巴利昔单抗、3.61mg 一水合磷酸二氢钠、0.50mg 磷酸氢二钠（无水）、0.80mg 氯化钠、10mg 蔗糖、40mg 甘露醇和 20mg 甘油，用 2.5ml 无菌注射用水 USP 重新溶解。每一支 20-mg 管形瓶含有 20mg 巴利昔单抗、7.21mg 磷酸二氢钾、0.99mg 磷酸氢二钠（无水）、1.61mg 氯化钠、20mg 蔗糖、80mg 甘露醇和 40mg 甘油，用 2.5ml 无菌注射用水 USP 重新溶解。不添加防腐剂。

[0017] ZENAPAX® (Roche Laboratories), 25mg/5 ml, 为用于进一步稀释和静脉内给药的澄清、无菌、无色浓缩物。每毫升 ZENAPAX® 含有 5mg 达克珠单抗和 3.6mg 一水合磷酸二氢钠、11mg 七水合磷酸氢二钠、4.6mg 氯化钠和 0.2mg 聚山梨酯 80 并且可含有盐酸或氢氧化钠以调节 pH 至 6.9。不添加防腐剂。

[0018] CTLA4Ig 分子可通过抑制 CD28-B7 相互作用干扰 T 细胞协同刺激。因此，CTLA4Ig 分子可用于治疗免疫系统疾病，例如类风湿性关节炎和与移植物移植相关的免疫紊乱。

[0019] 我们需要一种含有 CTLA4Ig 分子用于治疗免疫系统紊乱的稳定、有效、方便的制剂。

发明概述

[0020] 本发明提供了治疗免疫系统紊乱的制剂，其方式为给予受试者 CTLA4Ig 分子，其可与 B7 阳性细胞上的 B7 分子结合并因此抑制内源性 B7 分子与 CTLA4 和 / 或 CD28 在 T- 细胞上的结合。

[0021] 本发明的冻干制剂包含 CTLA4Ig 分子，其蛋白质与冻干保护剂的重量比至少为 1 : 2。冻干保护剂优选糖，更优选双糖，最优选蔗糖或麦芽糖。冻干制剂也可含有一种或多种选自缓冲剂、表面活性剂、填充剂和防腐剂中的组分。

[0022] 在某些实施方案中，用于稳定冻干药品的蔗糖或麦芽糖的量为蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比至少为 1 : 2，优选蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比至少为 1 : 2 至 1 : 5，更优选蛋白与蔗糖或麦芽糖的重量比约为 1 : 2。

[0023] 本发明的皮下 (SC) 制剂在含水载体中含有蛋白浓度至少为 100mg/ml 的 CTLA4Ig 分子与稳定化水平的糖，优选至少为 125mg/ml 的蛋白质浓度与稳定化水平的糖。该糖的优选重量比至少为蛋白质与糖 1 : 1.1。稳定剂的使用量优选不大于可能引起 SC 注射器给药时不利或不适当粘度的量。糖优选为二糖，最优选为蔗糖。SC 制剂也可含有一种或更多种选自缓冲剂、表面活性剂和防腐剂的组分。

[0024] 在某些实施方案中，用于稳定 CTLA4Ig 分子 SC 药品的蔗糖用量为蛋白质与蔗糖的重量比至少为 1 : 1，优选蛋白质与蔗糖的重量比为 1 : 3 至 1 : 5，更优选蛋白质与蔗糖的重量比约 1 : 1.4。

[0025] 本发明的液体制剂在含水载体中包含蛋白质浓度至少为 20mg/ml 的 CTLA4Ig 分子与稳定化水平的糖，优选至少 25mg/ml 与稳定化水平的糖。优选糖的重量比至少为蛋白质与糖 1 : 1。糖优选双糖，最优选蔗糖。该液体制剂也可含有一种或更多种选自缓冲剂、表面活性剂和防腐剂的组分。

[0026] 在某些实施方案中，用于稳定液体药品的蔗糖用量为蛋白质与蔗糖的重量比至少为 1 : 1，优选蛋白质与蔗糖的重量比为 1 : 2 至 1 : 10，更优选蛋白质与蔗糖的重量比约 1 : 2。

[0027] 在本发明的另一个实施方案中提供了制造品,其包括药品并优选提供其使用说明。

[0028] 本发明进一步提供了给予本发明 CTLA4Ig 分子制剂治疗免疫系统疾病和耐受诱导作用的方法。

附图简介

[0029] 图 1 显示了 CTLA4Ig 分子表达盒一部分的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1)。也显示了由该核酸编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。可由该表达盒生产的 CTLA4Ig 分子包括具有以下残基的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO :2 的 26-383, (ii)SEQ ID NO :2 的 26-382, (iii)SEQ ID NO :2 的 27-383 或 (iv)SEQ ID NO :2 的 26-382,或任选 (v)SEQ ID NO :2 的 25-382 或 (vi)SEQ ID NO :2 的 25-383。该表达盒包含以下区:(a) 抑瘤素 M 信号序列 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 11-88 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-26) ;(b) 人 CTLA4 的胞外结构域 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 89-463 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 27-151) ;(c) 人 IgG1 恒定区的被修饰部分 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 464-1159 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 152-383),包括被修饰的绞链区 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 464-508 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 152-166),被修饰的人 IgG1CH2 结构域 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 509-838 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 167-276)和人 IgG1 CH3 结构域 (SEQ ID NO :1 的核苷酸 839-1159 ;SEQ ID NO :2 的氨基酸 277-383)。

[0030] 图 2 描述了 CTLA4-L104EA29Y-Ig(也称作“L104EA29YIg”和“LEA29Y”)的核苷酸 (SEQ ID NO :3) 和氨基酸 (SEQ ID NO :4) 序列,其含有信号肽 ;突变的 CTLA4 胞外结构域,起于 +1 位的甲硫氨酸止于 +124 位的天冬氨酸或起于 -1 位的丙氨酸止于 +124 位的天冬氨酸 ;和 Ig 区。SEQ ID NO :3 和 4 分别描述了 L104EA29YIg 的核苷酸和氨基酸序列,其含有信号肽 ;突变的 CTLA4 胞外结构域,起于 +27 位置的甲硫氨酸止于 +150 位的天冬氨酸或起于 +26 位的丙氨酸止于 +150 位的天冬氨酸 ;和 Ig 区。L104EA29YIg 可具有以下残基的氨基酸序列:(i)SEQ ID NO :4 的 26-383, (ii)SEQ ID NO :4 的 26-382 ;(iii)SEQ ID NO :4 的 27-383 或 (iv)SEQ ID NO :4 的 27-382,或任选 (v)SEQ ID NO :4 的 25-382,或 (vi)SEQ ID NO :4 的 25-383。

发明详述

[0031] 如本文中使用的 :

[0032] “稳定的”制剂或药品为在保存过程中其中的 CTLA4Ig 分子可基本保持其物理和化学稳定性和完整性的制剂或药品。可在所选温度下经过所选时间段后测定 CTLA4Ig 分子制剂的稳定性。例如,冻干和保存后聚集形成的增加可作为冻干的 CTLA4Ig 分子制剂不稳定性的指标。除了聚集形成之外,在保存期间原有澄清度、颜色和气味的保持都可用作监控 CTLA4Ig 分子溶液稳定性的指标。HMW 种类为多聚体 (例如,四聚体,七聚体等),其分子量大于 CTLA4Ig 分子二聚体。通常,一种“稳定的”药品为于 2-8℃ 保存一年其中的聚集增加 (通过高分子量种类 (% HMW) 的增加测定) 小于约 5% 并优选 3% 的药品。所生产的药品优选含有小于约 25% 的 HMW 种类,优选小于约 15% HMW 种类,更优选小于约 10% HMW 种类,最优选小于约 5% HMW 种类。

[0033] 可通过分子排阻色谱 (SEC) 分离 CTLA4Ig 分子的单体、二聚体和 HMW 种类。SEC 基

于分子大小分离分子。当分子沿着柱子长度迁移时通过差别分子排阻或进入实现分离。因此,随着柱子长度的增加分离度增加。可使用串联了 TSK Gel®G3000SWXL (300mm×7.8mm) 和 TSK Gel®G3000SWXL(40mm×6.0mm) 柱 (Tosoh Bioscience, Montgomery, PA) 的 2695 Alliance HPLC (Waters, Milford, MA) 分离 CTLA4Ig 分子样品。可用含有 0.2M KH_2PO_4 和 0.9% NaCl, pH 6.8 的流动相在流速为 1.0ml/min 时分离 10mg/ml (20 μl 等分试样) 的样品。使用 Water's 2487 双波长检测器于 280nm 处检测样品吸光值。使用这一系统, HMW 种类的保留时间为 7.5min±1.0min。对每一个峰的峰下面积积分。HMW 种类峰面积除以总峰面积可计算得到% HMW 种类。

[0034] “重新溶解”制剂为通过将冻干制剂溶解于含水载体制备的制剂, 这样 CTLA4Ig 分子被溶解至重新溶解的制剂中。该重新溶解的制剂适用于对需要的病人进行静脉内给药 (IV)。

[0035] “等渗”制剂为与人血液具有基本相同的渗透压的制剂。等渗制剂的渗透压通常为 250 至 350mOsmol/KgH₂O。术语“高渗”用于描述渗透压高于人血液渗透压的制剂。例如可使用蒸汽压或冰冻型渗透压剂测量等渗性。

[0036] 术语“缓冲剂”指当加入至含水溶液中可防止加入酸或碱或溶剂稀释时溶液 pH 变化的一种或多种组分。除了磷酸盐缓冲液, 也可使用甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液及类似缓冲液, 其中钠、钾或铵可作为平衡离子。

[0037] “酸”为可在含水溶液中产生氢离子的物质。“药学可接受酸”包括无机和有机酸, 其在制剂中使用的浓度和方式是无毒性的。

[0038] “碱”为可在含水溶液中产生羟基离子的物质。“药学可接受的碱”包括无机和有机碱, 其在制剂中使用的浓度和方式是无毒性的。

[0039] “冻干保护剂”为当与相关蛋白质结合时可防止或降低该蛋白质在冻干和之后的储存过程中化学和 / 或物理不稳定性的分子。

[0040] “防腐剂”为可降低细菌作用的试剂, 可选择性加入本文的制剂中。加入防腐剂可, 例如, 辅助多剂量制剂的生产。可用的防腐剂实例包括十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯己双铵、苯扎氯铵 (十八 烷基二甲基苄基氯化铵的混合物, 其中的烷基为长链化合物) 和氯化苄乙铵。其它类型的防腐剂包括芳族醇, 例如苯酚、丁基和苯甲基醇, 烷基尼泊金类, 例如甲基或丙基尼泊金, 儿茶酚, 间苯二酚, 环己醇, 3- 戊醇和间甲酚。

[0041] “表面活性剂”为含有疏水部分 (例如烷基链) 和亲水部分 (例如羧基和羧酸基团) 的表面活性分子。可将表面活性剂加入本发明的制剂中。适用于本发明制剂的表面活性剂包括但不限于聚山梨酯 (例如聚山梨酯 20 或 80); 泊洛沙姆 (例如泊洛沙姆 188); 山梨坦酯及其衍生物; Triton; 十二烷基硫酸钠; 辛基糖苷钠; 十二烷基、十四烷基、亚油酰 - 或硬脂酰 - 磺基甜菜碱; 十二烷基、十四烷基、亚油酰或硬脂酰 - 肌氨酸; 亚油酰 -、十四烷基或十六烷基 - 甜菜碱; 月桂酰胺丙基 -、椰油酰胺丙基 -、亚油酰胺丙基 -、肉豆蔻酰胺丙基 -、棕榈酰胺丙基 - 或异硬脂酰胺丙基甜菜碱 (例如月桂酰胺丙基); 肉豆蔻酰胺丙基 -、棕榈酰胺丙基 - 或异硬脂酰胺丙基 - 二甲胺; 甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油酰基牛磺酸二钠; 和 MONAQUAT™ 系列 (Mona Industries, Inc., Paterson, N. J.); 聚乙二醇, 聚丙醇以及乙二醇和丙二醇的共聚物 (例如, Pluronic, PF68 等)。

[0042] “药物”指用于药物终产品制剂的起始材料。通常 CTLA4Ig 药物组合物含有浓度为

20mg/ml 至 60mg/ml, pH 7 至 8 的蛋白质并且 % HMW < 5%。

[0043] “已配制成的总体溶液”指注入容器之前的最终制剂,例如注入管形瓶用于冻干前的已配制成的溶液或注入用于 SC 注射的注射器之前的已配制成的溶液。

[0044] “药品”指包装于容器中的最终制剂,其可在使用前被重新溶解,例如冻干药品;使用前被稀释,例如液体药品;或被用作 SC 溶液药品。

[0045] 术语“CTLA4-Ig”或“CTLA4-Ig 分子”或“CTLA4Ig 分子”可交换使用,指至少包含具有 CTLA4 胞外结构域或其部分片段和免疫球蛋白恒定区或其部分片段的多肽的蛋白质分子。该胞外结构域和免疫蛋白恒定区可为野生型,或突变型或修饰型,和哺乳动物型,包括人和小鼠。该多肽可进一步包括附加蛋白结构域。CTLA4-Ig 分子也可指该多肽的多聚体形式,例如二聚体、四聚体和七聚体。CTLA4-Ig 分子也可与 CD80 和 / 或 CD86 结合。

[0046] 术语“B7-1”指 CD80;术语“B7-2”指 CD86;术语“B7”指 B7-1 和 B7-2 (CD80 和 CD86) 两者。术语“B7-1-Ig”或“B7-1Ig”指 CD80-Ig;术语“B7-2-Ig”或“B7-2Ig”指 CD86-Ig。

[0047] 在一个实施方案中,“CTLA4Ig”指具有以下残基的氨基酸序列的蛋白质分子:(i) SEQ ID NO:2 的 26-383, (ii) SEQ ID NO:2 的 26-382; (iii) SEQ ID NO:2 的 27-383, 或 (iv) SEQ ID NO:2 的 27-382, 或任选 (v) SEQ ID NO:2 的 25-382, 或 (vi) SEQ ID NO:2 的 25-383。在单体形式中,这些蛋白质可在本文中指“SEQ ID NO:2 单体,”或“具有 SEQ ID NO:2 序列的”单体。这些 SEQ ID NO:2 单体可二聚体化,这些二聚体组合可包括,例如:(i) 和 (i); (i) 和 (ii); (i) 和 (iii); (i) 和 (iv); (i) 和 (v); (i) 和 (vi); (ii) 和 (ii); (ii) 和 (iii); (ii) 和 (iv); (ii) 和 (v); (ii) 和 (vi); (iii) 和 (iii); (iii) 和 (iv); (iii) 和 (v); (iii) 和 (vi); (iv) 和 (iv); (iv) 和 (v); (iv) 和 (vi); (v) 和 (v); (v) 和 (vi); 和, (vi) 和 (vi)。这些不同的二聚体组合也可以相互组合形成四聚体 CTLA4Ig 分子。这些单体、二聚体、四聚体和其它多聚体可在本文中指“SEQ ID NO:2 蛋白质”或“具有 SEQ ID NO:2 序列”的蛋白质。(编码如 SEQ ID NO:2 中所示 CTLA4Ig 的 DNA 按照布达佩斯条约的规定于 1991 年 5 月 31 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, ATCC 登录号 ATCC 68629; 表达如 SEQ ID NO:2 所示 CTLA4Ig 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系于 1991 年 5 月 31 日保藏, ATCC 标识号为 CRL-10762)。如本文所使用,“Abatacept”指 SEQ ID NO:2 蛋白。

[0048] 在一个实施方案中, CTLA4-L104EA29Y-Ig (有时称作“LEA29Y”或“L104EA29Y”) 为基因工程融合蛋白, 与 SEQ ID NO:1 所示的 CTAL4-Ig 分子具有相似的结构。L104EA29Y-Ig 具有被修饰的人 CTLA4 功能性胞外结合结构域和 IgG1 类人免疫球蛋白的 Fc 结构域。对 CTLA4 结构域 B7 结合区域的两个氨基酸进行修饰以产生 L104EA29Y, 将 104 位 (L104E) 的亮氨酸突变为谷氨酸 (在 SEQ ID NO:2 的 130 位) 并将 29 位 (A29Y) 的丙氨酸突变为酪氨酸 (在 SEQ ID NO:2 的 55 位)。SEQ ID NOS:3 和 4 分别描述了含有信号肽的 L104EA29YIg 的核苷酸和氨基酸序列; 突变的 CTLA4 胞外结构域, 起于 +27 位的甲硫氨酸, 止于 +150 位的天冬氨酸, 或起于 +26 位的丙氨酸, 止于 +150 位的天冬氨酸; 和 Ig 区。编码 L104EA29Y-Ig 的 DNA 按照布达佩斯条约的规定于 2000 年 6 月 20 日保存于美国典型培养物保藏中心 (ATCC)。ATCC 登录号为 PTA-2104。美国专利 7094874 (颁发于 2006 年 8 月 22 日) 和 WO 01/923337 A2 中进一步描述了 L104EA29Y-Ig, 均以其整体并于本文以作参考。

[0049] 在哺乳细胞中表达 L104EA29YIg 可产生 N- 和 C- 端突变体, 因此所产生的蛋白质可具有以下残基的氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:4 的 26-383, (ii) SEQ ID NO:4 的 26-382; (iii) SEQ ID NO:4 的 27-383 或 (iv) SEQ ID NO:4 的 27-382, 或任选 (v) SEQ ID NO:4 的 25-382, 或 (vi) SEQ ID NO:4 的 25-383。如果为单体形式, 这些蛋白质在本文中可指“SEQ ID NO:4 单体”或“具有 SEQ ID NO:4 序列”的单体。这些蛋白质可二聚体化, 这些二聚体组合可包括, 例如: (i) 和 (i); (i) 和 (ii); (i) 和 (iii); (i) 和 (iv); (i) 和 (v); (i) 和 (vi); (ii) 和 (ii); (ii) 和 (iii); (ii) 和 (iv); (ii) 和 (v); (ii) 和 (vi); (iii) 和 (iii); (iii) 和 (iv); (iii) 和 (v); (iii) 和 (vi); (iv) 和 (iv); (iv) 和 (v); (iv) 和 (vi); (v) 和 (v); (v) 和 (vi); 和, (vi) 和 (vi)。这些不同的二聚体组合也可以相互组合形成四聚体 L104EA29YIg 分子。这些单体、二聚体、四聚体和其它多聚体在本文中可指“SEQ ID NO:4 蛋白质”或“具有 SEQ ID NO:4 序列”的蛋白质。如本文所使用, “Belatacept”指 SEQ ID NO:4 蛋白。

CTLA4-Ig 单体和多聚体

[0050] CTLA4-Ig 分子包括, 例如 CTLA4-Ig 蛋白单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体或其它多聚体形式。CTLA4-Ig 分子可包含至少具有一个 CTLA4 胞外结构域和一个免疫球蛋白恒定区的蛋白质融合。CTLA4-Ig 分子可具有野生型或突变型序列, 例如 CTLA4 的胞外域和免疫球蛋白恒定区序列。单独 CTLA4-Ig 单体或二聚体、四聚体或其它多聚体形式均可被糖基化。

[0051] 在一些实施方案中, 本发明提供至少具有一定百分比的二聚体或其它多聚体分子的 CTLA4-Ig 分子群。例如, 本发明提供 CTLA4-Ig 二聚体大于 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 的 CTLA4-Ig 分子群。在一个实施方案中, 本发明提供含有约 95% 至约 99.5% CTLA4-Ig 二聚体和约 0.5% 至约 5% CTLA4-Ig 四聚体的 CTLA4-Ig 分子群。在另一个实施方案中, CTLA4-Ig 分子群含有约 98% 的 CTLA4-Ig 二聚体、约 1.5% 的 CTLA4-Ig 四聚体和约 0.5% 的 CTLA4-Ig 单体。

[0052] 在一个实施方案中, 本发明提供了基本不含 CTLA4-Ig 单体分子的 CTLA4-Ig 分子群。基本不含 CTLA4-Ig 单体分子可指具有少于 1%、0.5% 或 0.1% 单体的 CTLA4-Ig 分子群。[0052] 在一个实施方案中, 本发明提供了基本不含大于二聚体, 例如四聚体、六聚体等的 CTLA4-Ig 多聚体的 CTLA4-Ig 分子群。基本不含大于二聚体的 CTLA4-Ig 多聚体可指含有少于 6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5% 或 0.1% 大于二聚体的 CTLA4-Ig 多聚体的 CTLA4-Ig 分子群。

[0053] 在一个实施方案中, CTLA4-Ig 单体分子可具有, 例如, 以下氨基酸序列: (i) SEQ ID NO:2 的 26-383, (ii) SEQ ID NO:2 的 26-382 (iii) SEQ ID NO:2 的 27-383, 或 (iv) SEQ ID NO:2 的 27-382 或任选 (v) SEQ ID NO:2 的 25-382 或 (vi) SEQ ID NO:2 的 25-383。当在 CHO 细胞中表达含有 SEQ ID NO:1 氨基酸序列的表达盒时, 所表达的大多数单体形式具有甲硫氨酸 (SEQ ID NO:2 的残基 27) N- 端氨基酸残基, 其与野生型人 CTLA4 的 N- 端氨基酸残基一致。但是, 由于 SEQ ID NO:1 也包括抑瘤素 M 信号序列 (SEQ ID NO:1 的 11-88 核苷酸) 的编码序列, 所以从 SEQ ID NO:1 表达的蛋白质包括抑瘤素 M 信号序列。在蛋白质运出细胞质或分泌出细胞的过程中, 该信号序列从所表达的蛋白质上剪切下来。但是该剪切

过程可产生 N-端突变体,例如氨基酸残基 25 至 26 之间的剪切(得到残基 26 的 N-端,如“丙氨酸变异体”),或氨基酸残基 24 至 25 之间(得到残基 2 的 N-端,如“天冬氨酸-丙氨酸变异体”),与氨基酸残基 26 至 27 之间的剪切相反(得到残基 27 的 N-端)。例如,天冬氨酸-丙氨酸变异体可以约 1%存在于 CTLA4-Ig 分子混合物中,丙氨酸变异体可以 8-10%存在于 CTLA4-Ig 分子混合物中。此外,由于不完全加工,从 SEQ ID NO:1 表达的蛋白质可具有 C-端变异体。大多数 C-端为 SEQ ID NO:2 残基 382 的甘氨酸。在 CTLA4-Ig 分子混合物中可存在例如约 4-5%具有 C-端赖氨酸(SEQ ID NO:2 的残基 383)的单体。

[0054] CTLA4-Ig 单体分子可含有人 CTLA4 的胞外结构域。在一个实施方案中,该胞外结构域可包含编码 SEQ ID NO:2 的氨基酸 27-151 的 SEQ ID NO:1 的核苷酸 89-463 的核苷酸序列。在另一个实施方案中,该胞外结构域可包含人 CTLA4 的突变序列。在另一个实施方案中,该胞外结构域可包含 SEQ ID NO:1 核苷酸 89-463 的核苷酸变化,这样就改变了保守氨基酸。在另一个实施方案中,该胞外结构域可包含至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%与 SEQ ID NO:1 核苷酸 89-463 相同的核苷酸序列。

[0055] CTLA4-Ig 单体分子可含有人免疫球蛋白的恒定区。该恒定区可为一个恒定区的一部分;该恒定区可具有野生型或突变型序列。该恒定区可源自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。该恒定区可源自免疫球蛋白的轻链或重链。当该恒定区源自 IgG、IgD 或 IgA 分子时,该恒定区含有一个或更多个以下恒定区结构域:CL、CH1、铰链区、CH2 或 CH3。当该恒定区源自 IgM 或 IgE 时,该恒定区含有一个或更多个以下恒定区结构域:CL、CH1、CH2、CH3 或 Ca4。在一个实施方案中,该恒定区可包含一个或更多个源自 IgG、IgD、IgA、IgM 或 IgE 的结构域。

[0056] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 单体分子含有被修饰的人 IgG1 铰链区(SEQ ID NO:1 的核苷酸 464-508;SEQ ID NO:2 的氨基酸 152-166),其中 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 156、162 和 165 的丝氨酸来自于野生型序列中的半胱氨酸。

[0057] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 单体分子含有被修饰的人 IgG1 CH2 区和野生型 CH3 区(具有 SEQ ID NO:1 核苷酸 509-838 和 SEQ ID NO:2 氨基酸 167-276 的被修饰人 IgG1 CH2 结构域;含有 SEQ ID NO:1 核苷酸 839-1159 和 SEQ ID NO:2 氨基酸 277-383 的人 IgG1 CH3 结构域)。

[0058] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 分子群含有具有以下序列的单体,如 2006 年 8 月 22 日颁发的美国专利 7,094,874 的图 7、8 或 9 中任一个或多个中以及公布号为 US20030083246 和 US20040022787 的美国专利申请中所显示的序列,其均以其整体并于本文作为参考。

[0059] 在一个实施方案中,CTLA4-Ig 四聚体分子含有两对 CTLA4-Ig 多肽或两个 CTLA4-Ig 多肽二聚体,其中各多肽具有以下氨基酸序列之一:(i)SEQ ID NO:2 的 26-383,(ii)SEQ ID NO:2 的 26-382,(iii)SEQ ID NO:2 的 27-383,或(iv)SEQ ID NO:2 的 27-382,或任选(v)SEQ ID NO:2 的 25-382 或(vi)SEQ ID NO:2 的 25-383。多肽对或二聚体的每一成员与另一成员共价连接,并且两对多肽之间非共价连接并由此形成四聚体。该四聚体分子可与 CD80 或 CD86 结合。

[0060] 在另一个实施方案中,该四聚体分子可与 CD80 或 CD86 结合,其亲和力至少比 CTLA4-Ig 二聚体(其单体具有上述氨基酸序列之一)与 CD80 或 CD86 的亲和力大 2 倍。在

另一个实施方案中,该四聚体可与 CD80 或 CD86 结合,其亲和力至少比野生型 CTLA4 与 CD80 或 CD86 的亲和力大 2 倍。这一更大的亲和力有助于在治疗免疫紊乱和其它下述疾病中的达到更高的药效。此外,更高或经提高的亲和力可产生更高的药效强度。例如,含有 CTLA4-Ig 四聚体的医药组合物将具有更高的亲和力并因此比相同量的含有 CTLA4-Ig 单聚体的医药组合物具有更高的药效强度。在另一个实施方案中,该四聚体分子对 T 细胞增殖的抑制比 CTLA4-Ig 二聚体相(其单聚体具有以上氨基酸序列之一)大 2 倍。在另一个实施方案中,该四聚体分子对 T 细胞增殖的抑制比野生型 CTLA4 分子至少大 2 倍。

[0061] 可使用本技术领域标准测定法检测 T 细胞增殖,例如,最常用的检测 T 细胞增殖的方法之一为通过抗原或 TCR 的激动性抗体激活 T 细胞并检测,例如氟(titrated)-胸腺嘧啶(3H-TdR)掺入增殖 T 细胞的情况,或增殖 T 细胞释放至培养基中的细胞因子的量。可由此测定 CTLA4-Ig 分子对 T 细胞激活或增殖的抑制作用。

[0062] CTLA4-Ig 分子的亲和性为该分子与单链,包括 CD80、CD86 或 CD80Ig 或 CD86Ig 融合蛋白的结合力。可使用例如基于表面等离子共振技术的结合相互作用分析(BIA)测定 CTLA4-Ig 与配体的亲和性。除了检测结合力,它还使结合动力学例如结合和解离速率常数等得以实时测定。将一种由金属薄膜包被的玻片(与表面基质共价结合)组成的传感器芯片用相互作用物之一即 CTLA4-Ig 或配体之一包被。使含有其它相互作用物的溶液流过该表面。将一连续光束照射表面的另一侧,测量其反射角。当 CTLA4-Ig 与配体结合时,光束的共振角发生变化(因为其取决于传感器反应侧邻近介质的屈光指数,其与介质中溶解物质的浓度直接相关)。接着由计算机辅助分析。

[0063] 在一个实施方案中,可在 BIAcore 仪器(BIAcore AG, Uppsala, Sweden)上通过表面等离子共振(SPR)进行 CTLA4-Ig 结合试验。CTLA4-Ig 可通过伯胺基团共价偶联至 BIAcore 传感器芯片上的羧甲基葡聚糖基质上,从而将 CTLA4-Ig 固定至芯片上。或者,可用抗恒定区抗体将 CTLA4-Ig 通过 Ig 片段间接固定至传感器表面。然后,将配体加入芯片以检测 CTLA4-Ig 与配体的结合。可根据 vander Merwe, P. 等, J. Exp. Med. (1997) 185(3) : 393-404 描述的方法进行亲和力测定。

[0064] 可测定 CTLA4-Ig 分子的亲和力。亲和力可定义为两个分子或细胞之间在多位点上的总结合力。亲和力(avidity)与亲和性(affinity)不同,后者为一个分子上的某一位点与其配体的结合强度。不受理论的约束,更高的 CTLA4-Ig 分子亲合力可增强 CTLA4-Ig 分子对 T-细胞增殖和激活的药效强度。可通过两类固相分析测定亲合力,例如:a) 竞争抑制检测和 b) 洗脱检测。在两种情况下,配体均与固相载体结合。在竞争性抑制检测中,将固定浓度的 CTLA4-Ig 分子与不同浓度的配体加入溶液中,测定可抑制 50% 固相结合的配体数量。所需配体越少,亲合力越强。在洗脱检测中,将配体加入溶液中。在达到平衡态之后,加入不同浓度的离液剂或变性剂(如异硫氰酸盐、尿素或二乙胺)干扰 CTLA4-Ig/配体相互作用。然后用 ELISA 测定 CTLA4-Ig 抗性洗脱液的量。亲合力越高,用于洗脱某一数量 CTLA4-Ig 所需的离液剂越多。CTLA4-Ig 分子异质混合物的相对亲合力可以表示为亲和力指数(AI),等于洗脱 50% 结合 CTLA4-Ig 分子所需的洗脱剂浓度。可通过测定不同浓度的洗脱剂洗脱的 CTLA4-Ig 百分比进行精细分析。生产本发明 CTLA4-Ig 分子的方法

[0065] 可在原核细胞中表达 CTLA4-Ig 分子。各种细菌株可通常代表大多数的原核细胞。细菌可为革兰氏阳性菌或革兰氏阴性。通常优选革兰氏阴性菌例如大肠杆菌(E. coli)。也

可使用其它微生物株。

[0066] 将如上所述的编码 CTLA4-Ig 分子的序列插入用于表达外原序列的原核细胞载体中,例如大肠杆菌。这些载体可包括通常使用的原核控制序列,其在本文定义为包括用于起始转录的启动子,任选含有操纵子,以及核糖体结合位点序列,包括这些常用的启动子例如 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖(lac)启动子系统(Chang,等,(1977)Nature 198:1056)、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel,等,(1980)Nucleic Acids Res. 8:4057)以及 λ 衍生 P_L 启动子和 N- 基因核糖体结合位点(Shimatake,等,(1981)Nature 292:128)。

[0067] 这样的表达载体也包括复制起点和可筛选标记,例如使其具有抗生素抗性的 β -内酰胺酶和新霉素磷酸转移酶基因,这样载体可在细菌内复制并且可在抗生素(例如氨基苄西林或卡那霉素)存在下生长从而筛选携带质粒的细胞。

[0068] 可通过各种标准方法将表达质粒导入原核细胞,包括但不限于 CaCl_2 休克(Cohen,(1972)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110 和 Sambrook 等.(eds.),“分子克隆:实验室手册”(“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”),第二版,冷泉港出版社(1989))和电穿孔。

[0069] 与本发明的实践一致,真核细胞也可作为适当的宿主细胞。真核细胞的实例包括任何动物细胞,原始的或固定化的,酵母(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*))和植物细胞。骨髓瘤、COS 和 CHO 细胞可作为宿主的动物细胞实例。尤其是 CHO 细胞包括但不限于 DG44(Chasin,等.,1986 Som. Cell. Molec. Genet. 12:555-556;Kolkekar 1997 Biochemistry 36:10901-10909)、CHO-K1(ATCC No. CCL-61)、CHO-K1 Tet-On 细胞系(Clontech)、标为 ECACC 85050302 的 CHO(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK),CHO 克隆 13(GEIMG, Genova, IT)、CHO 克隆 B(GEIMG, Genova, IT)、标为 ECACC 93061607 的 CHO-K1/SF(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)和标为 ECACC 92052129 的 RR-CHOK1(CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK)。示例性植物细胞包括烟草(全植物、细胞培养物或愈伤组织)、玉米、大豆和水稻细胞。玉米、大豆和水稻细胞也可接受。

[0070] 也可将上述编码 CTLA4Ig 分子的核酸序列插入用于表达外源序列的真核宿主中。该载体的调控元件依具体的真核宿主而不同。

[0071] 用于表达载体的常用真核控制序列包括与哺乳动物细胞相容的启动子和控制序列,例如 CMV 启动子(CDM8 载体)和鸟类肉瘤病毒(ASV)(π LN 载体)。其它常用启动子包括猿猴病毒 40(SV40)(Fiers,等,(1973)Nature 273:113)的早期和晚期启动子,或其它病毒启动子,例如衍生自多瘤、腺病毒 2 和牛乳头状瘤病毒的启动子。也可使用诱导型启动子,例如 hMTII(Karin,等,(1982)Nature 299:797-802)。

[0072] 在真核细胞中表达 CTLA4Ig 分子的载体也可携带被称作增强子区的序列。这些对于优化基因表达是非常重要的并且存在于启动子区的上游或下游。

[0073] 用于真核宿主细胞的表达载体实例包括但不限于哺乳动物宿主细胞载体(例如, BPV-1、pHyg、pRSV、pSV2、pTK2(Maniatis);pIRES(Clontech);pRc/CMV2、pRc/RSV、pSFV1(Life Technologies);pVPakc 载体、pCMV 载体、pSG5 载体(Stratagene))、逆转录病毒载体(例如,pFB 载体(Stratagene)),pCDNA-3(Invitrogen)或其修饰形式、腺病毒载体;腺伴随病毒载体、杆状病毒载体、酵母载体(例如,pESC 载体(Stratagene))。

[0074] 可将编码 CTLA4Ig 分子的核酸序列整合至真核宿主细胞的基因组中并按照宿主基因组复制的方式复制。或者,携带 CTLA4Ig 分子的载体可含有允许染色体外复制的复制起点。

[0075] 对于在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中表达核酸序列,可使用来自酵母质粒的复制起点 2 μ 环 (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101 :307)。或者,可使用来自酵母基因组可启动自主复制的序列 (见例如, Stinchcomb 等, (1979) *Nature* 282 :39 ;Tschemper 等., (1980) *Gene* 10 :157 ;和 Clarke 等, (1983) *Meth. Enz.* 101 :300)。

[0076] 酵母载体的转录控制序列包括用于合成糖酵解酶 (Hess 等., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7 :149 ;Holland 等, (1978) *Biochemistry* 17 :4900) 的启动子。本技术领域已知的其它启动子包括 CDM8 载体 (Toyama 核 Okayama, (1990) *FEBS* 268 :217-221) 中提供的 CMV 启动子、3- 磷酸甘油酸酯激酶的启动子 (Hitzeman 等., (1980) *J. Biol. Chem.* 255 :2073) 和其它糖酵解酶的启动子。

[0077] 其它启动子为诱导型,因为它们受环境刺激和细胞生长培养基的调节。这些诱导型启动子包括热休克蛋白、醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酯酶、与氮分解代谢相关的酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的基因。

[0078] 调控序列可位于编码序列的 3' 端。这些序列可稳定信使 RNA。这些终止子存在于一些由酵母衍生和哺乳动物基因的编码序列之后的 3' 非翻译区。

[0079] 示例性植物载体和植物细胞包括但不限于农杆菌 Ti 质粒、花椰菜花叶病毒 (CaMV) 和番茄金花叶病毒 (TGMV)。

[0080] 哺乳细胞的转化方法包括但不限于磷酸钙存在下的转染、显微注射、电穿孔或通过病毒载体转导。

[0081] 将外源 DNA 导入植物或酵母基因组的方法包括 (1) 机械方法,例如将 DNA 显微注射入单核细胞或原生质体,在 DNA 存在下与玻璃珠一起涡旋细胞或将 DNA 包被的钨或金微粒射入细胞或原生质体;(2) 用聚乙二醇处理或高电压电脉冲 (电穿孔) 使细胞膜可透过大分子;或 (3) 使用可与细胞膜融合的脂质体 (含有 cDNA)。

[0082] 美国专利申请美国公开号 20050019859 和美国专利申请美国公开号 20050084933 教导了用动物或哺乳动物细胞培养生产本发明蛋白质,特别是重组糖蛋白产品的方法,这些文献通过引用并入本文。

[0083] 在细胞培养过程的蛋白质生产阶段之后,使用本领域技术人员已知的技术从细胞培养基中回收 CTLA4Ig 分子。尤其是将 CTLA4Ig 分子作为分泌型多肽从培养基中回收。

[0084] 首先将培养基离心去除细胞碎片和颗粒。然后从污染性 DNA、可溶性蛋白和多肽中纯化所需要的蛋白质,使用以下本技术领域已建立的非限制性纯化操作:SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;乙醇沉淀;免疫亲和或离子交换色谱分级分离;反相 HPLC;二氧化硅色谱或阴离子交换树脂例如 QAE 或 DEAE 色谱;色谱聚焦;使用例如 Sephadex G-75™ 柱凝胶过滤;和使用蛋白 A Sepharose™ 柱去除污染物例如 IgG。加入蛋白酶抑制剂,例如苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 或者也可使用蛋白酶抑制剂混合物抑制纯化过程中的蛋白水解降解。本领域技术人员将认识到适用于感兴趣蛋白质 (例如糖蛋白) 的纯化方法需要一些改变以应对在重组细胞培养中表达时蛋白质性质的改变。

[0085] 为糖蛋白的糖基团选用的纯化技术和方法也属于本发明范畴。例如,该技术包括

HPLC或使用阳离子-或阴离子-树脂的离子交换色谱法,其中收集碱性或酸性更强的流分,这取决于所选择的糖。使用这些技术也可同时去除污染物。

[0086] 纯化方法可进一步包括将可能存在于哺乳细胞系细胞培养基中的病毒和/或逆转录病毒失活和/或去除的附加步骤。可利用许多清除病毒的步骤,包括但不限于用离液剂处理,离液剂例如尿素或胍、去污剂;附加的超滤/透析步骤;常规分离,例如离子交换或分子排阻色谱;极端 pH;加热;蛋白酶;有机溶剂或其任何组合。

[0087] 在保存或进一步处理之前,已纯化的 CTLA4Ig 分子需要浓缩和交换缓冲液。可使用 Pall Filtron TFF 系统浓缩并将来自之前纯化柱的洗脱液交换成适用于药物的终缓冲液。

[0088] 在一方面,可将已纯化的 CTLA4Ig 分子(已浓缩并经过透析)装入 2-L Biotainer®瓶、50-L 生物加工袋或任何其它适当的容器中。这些容器中的 CTLA4Ig 分子可于 2℃至 8℃在冰冻之前保存 60 天。CTLA4Ig 分子于 2℃至 8℃更长时间的保存可能导致 HMW 的增加。因此,对于长期保存,可在保存前将 CTLA4Ig 分子于 -70℃冷冻并于约 -40℃保存。冷冻温度的可变范围为约 -50℃至约 -90℃。冷冻时间可以变化,主要取决于含有 CTLA4Ig 分子的容器的容积和冷冻箱中装载容器的数量。例如,在一个实施方案中,CTLA4Ig 分子保存在 2-L Biotainer®瓶中。在冷冻箱中装载少于 4 个 2-L Biotainer®瓶时需要约 14-18 小时的冷冻时间。装载至少 4 个 2-L Biotainer®瓶时需要约 18-24 小时的冷冻时间。将装有冰冻 CTLA4Ig 分子的容器保存于 -35℃至约 -55℃。在 -35℃至约 -55℃的保存时间可以变化并且可短至 18 小时。可有控制地将冷冻药物溶解用于配制药剂。

[0089] 在 2005 年 12 月 20 日申请的同时待审美国专利申请序列号 60/752267 和 2006 年 10 月 5 日申请的 06/849543 和 2006 年 12 月 19 日申请的标题为“细胞系、组合物和生产该组合物的方法”,发明人为 Kirk Leister 的 PCT 专利申请 10734 PCT 描述了通过动物或哺乳细胞培养生产本发明蛋白质特别是重组糖蛋白产品的方法。

本发明的低压冻干制剂

[0090] 本发明的低压冻干制剂包含 CTLA4Ig 分子,其中蛋白质与冻干保护剂的重量比至少为 1 : 2。冻干保护剂优选糖,更优选双糖,最优选蔗糖或麦芽糖。低压冻干制剂也可包含一种或多种选自缓冲剂、表面活性剂、填充剂和防腐剂的组分。

[0091] 在药物制剂开发研究中评价各种赋形剂对 CTLA4Ig 分子的溶液-稳定性和冻干、固相-稳定性的影响。

[0092] 不存在稳定剂时冻干 CTLA4Ig 分子的不稳定性明显说明了需要在制剂中包含冻干保护剂。起始筛选研究表明药品在糖(例如麦芽糖和蔗糖)和氨基酸(例如精氨酸和赖氨酸)存在下是稳定的。多元醇(例如甘露醇)和多糖(例如右旋糖酐 40)不利于其稳定性。优选的冻干保护剂为二糖麦芽糖和乳糖。

[0093] 实施例 VI 描述了冻干 Abatacept 药品在麦芽糖存在下保存于 50℃的稳定性研究。使用稳定性-指示分子排阻色谱(SE-HPLC)测定法监控所有高分子量(HMW)种类的增加。结果表明麦芽糖存在下 CTLA4Ig 分子冻干固相形式的稳定性增强。

[0094] 用于稳定化低压冻干药品的蔗糖或麦芽糖的量为蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比至少为 1 : 2,优选蛋白质与蔗糖或麦芽糖的重量比为 1 : 2 至 1 : 5,更优选蛋白质与

蔗糖或麦芽糖的重量比约为 1 : 2。

[0095] 如果必要的话,在低压冻干之前加入药学可接受的酸和 / 或碱设定制剂的 pH。优选的药学可接受的酸为盐酸。优选的碱为氢氧化钠。

[0096] 在制剂开发中,作为 pH 的函数而研究冻干药品的稳定性。实施例 VI 描述了作为 pH 函数的冻干 Abatacept 药品的稳定性研究。在冻干之前将溶液 pH 调至 6 至 8。将样品放置于稳态并使用稳定性 - 指示分子排阻色谱 (SE-HPLC) 测定法检测各时间点高分子量种类的增加。在建议保存条件 2° -8℃ 下,没有观察到 HMW 种类形成速度的显著变化。此外;在早期研发过程中得到的溶液状态稳定性数据显示最大稳定性的 pH 为 7 至 8。低压冻干药品可接受的 pH 范围为 7-8,优选的目标 pH 为 7.5。

[0097] 在另一方面,可加入至少 10mM 的盐或缓冲液组分,优选 10-200mM。这些盐和 / 或缓冲液为药学可接受的并衍生自己知的酸 (无机的和有机的) 和“可形成碱”的金属或胺。除了磷酸缓冲液,也可使用甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液及类似缓冲液,其中 钠、钾或铵离子可作为平衡离子。

[0098] “填充剂”为可增加低压冻干混合物质量并有利于低压冻干结块的物理结构 (例如有助于产生可保持开孔结构的基本均一的低压冻干结块) 的化合物。示例性填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨醇。本发明的低压冻干制剂可包含这些填充剂。

[0099] 本发明制剂可任选加入防腐剂以降低细菌作用。加入防腐剂,例如,可有助于生产多次使用 (多剂量) 制剂。

[0100] 本领域技术人员可选择装入管形瓶中的药品量,取决于所需要的剂量和具体治疗的给药方案。例如,每支管形瓶中 CTLA4Ig 的浓度可在 50-300mg/ 管形瓶的范围内变化,优选 100-250mg/ 管形瓶。

[0101] 典型低压冻干 Abatacept 药品的组成如表 1 所示。表 1 低压冻干 Abatacept 药品 (250mg/ 管形瓶) 的组成

组分	量 (mg/ 管形瓶) ^a
Abatacept	262.5
一水合麦芽糖	525
一水合磷酸二氢钠 ^b	18.1
氯化钠 ^b	15.3
盐酸	调节至 pH 7.5
氢氧化钠	调节至 pH 7.5

[0102] ^a 包括 5% 过量填充用于补偿管形瓶、针头、注射器损失 ^b 这些组分存在于 abatacept 药物溶液中

[0103] 典型低压冻干 Belatacept 药品的组成如表 2 所示。表 2 低压冻干 Belatacept 药品 (100mg/ 管形瓶) 的组成

组分	量 (mg/ 管形瓶) ^b
Belatacept	110 ^a
蔗糖	220
一水合磷酸二氢钠	15.18
组分	量 (mg/ 管形瓶) ^b
氯化钠	2.55
1N 氢氧化钠	调节至 pH 7.5
1N 盐酸	调节至 pH 7.5

[0104] ^a 每支管形瓶包含 10% 过量填充用于补偿重新溶解的溶液在管形瓶、针头、注射器中的残留

[0105] 用含水载体溶解低压冻干药品。本文感兴趣的含水载体为药学可接受的（对于人体给药安全无毒）并在低压冻干之后可用于制备液体制剂的载体。示例性稀释剂包括无菌注射用水（SWFI）、抑菌性注射用水（BWFI）、pH 经缓冲的溶液（磷酸盐缓冲生理盐水）、无菌生理盐水溶液、林格氏液或葡萄糖溶液。

[0106] 本发明的低压冻干药品优选无菌注射用水、USP (SWFI) 或 0.9% 氯化钠注射，USP 溶解。在溶解过程中，低压冻干粉末快速溶解形成澄清、无色溶液。

[0107] 通常，用 10ml 无菌注射用水 USP (SWFI) 或 0.9% 氯化钠注射液将本发明的低压冻干药品溶解至约 25mg/ml。将溶解得到的溶液进一步用 0.9% 氯化钠注射液 USP 稀释至 1-10mg/ml。被稀释的注射药品是等渗的并适用于静脉输注给药。

[0108] 在早期的临床研发中发现配制的低压冻干药品溶液与常用于制备和肠道外产品给药的一次性硅化处理注射器不相容。具体而言，当配制的药品溶液在这些注射器中保存超过 10-15 分钟后会形成丝状凝胶颗粒。进一步研究表明这一不相容性是由于药品与硅油（二甲基硅醚）之间发生反应。这些颗粒的形成并不影响药品溶液在使用中的药效。优选使用无硅氧烷注射器配制药品并将从管形瓶中配制的溶液转移至静脉袋中。

[0109] 或者，也可在制剂中加入表面活性剂以降低或防止配制的药品与硅化处理的注射器发生反应，例如加入足够量的表面活性剂。

[0110] 低压冻干制剂的建议保存条件为 2-8°C，建议保存期限为至少 12 个月。

低压冻干制剂的制备

[0111] 低压冻干药品生产过程包含将已配制的总体溶液分批低压冻干、无菌过滤、装入管形瓶、在冷冻干燥室冷冻，然后低压冻干、加塞和加盖。

[0112] 实施例 III 和 IV 分别描述了生产低压冻干 Abatacept 和 Belatacept 药品。

[0113] 通常将已配制的总体溶液设定为固定的蛋白质浓度，这样装入管形瓶的体积可保持恒定。在加入冻干保护剂时，将混合仪速度控制在 250 ± 50 rpm 以尽量减少批溶液中的泡沫并确保冻干保护剂在 10-20 分钟内完全溶解。已配制的总体溶液在低压冻干前可于 2° -8°C 或室温日光下保存至少 32 小时。

[0114] 由于 CTLA4Ig 分子的热敏感性，已配制的总体溶液不进行终灭菌。可使用一系列的 0.22- μ m Millipore Millipak® 除菌级滤膜在注入管形瓶低压冻干之前将已配制的总体溶液灭菌。

[0115] 对选供本产品使用的冷冻干燥周期加以优化，以在干燥的第一和第二相中分别达到有效升华和蒸发而不降低产品质量。

[0116] 为了辅助低压冻干粉末的快速溶解并防止配制药品中形成过量泡沫，在低压冻干周期的末期在 500 ± 100 微米室压下将低压冻干管形瓶加塞。

[0117] 本领域技术人员将意识到需要将容器过量填充以补偿制备和注射中管形瓶、针和注射器的残留。例如，每支 Abatacept 药品管形瓶为 250mg/ml 含有 5% 过量填充药品以补偿重新配制和抽取时的损失。

液体皮下制剂

[0118] 本领域技术人员将认识到对于需要频繁、长期治疗的患者而言 IV 制剂的不方便。患者需要经常到医院去进行静脉输注以获得药物,输注的时间可能长至 1 小时。因此,皮下制剂可实现家庭自给药,对于上述患者是有益的。

[0119] 对于皮下给药,需要高蛋白浓度的剂量。用大于 1mg/kg (> 100mg/剂量) 的高剂量治疗需要研发浓度超过 100mg/ml 的制剂,这是由于小体积 (< 1.5ml) 才可通过 SC 途径给药。为了防止形成高分子量种类优化高浓度的长期稳定性,进行制剂开发研究以评价各种赋形剂对本发明的液体 SC 制剂溶液状态稳定性的作用。

[0120] 本发明的 SC 制剂包含蛋白浓度至少为 100mg/ml 的 CTLA4Ig 分子与稳定化水平的糖,优选含水载体中蛋白质浓度至少为 125mg/ml 与稳定化水平的糖。优选蛋白质与糖的重量比至少为 1 : 1.1。稳定剂的用量优选不大于可能引起 SC 注射器给药中不利或不适粘度的量。糖优选双糖,最优选蔗糖。SC 制剂也可包含一种或多种选自缓冲剂、表面活性剂和防腐剂的组分。

[0121] 在各种包括糖、多糖、氨基酸、表面活性剂、聚合物、环糊精、蛋白质等的稳定剂存在下评价 SC 制剂的稳定性曲线。在所有被评价的赋形剂中,糖例如蔗糖、甘露醇和海藻糖具有更好的防止高分子量种类形成的稳定化作用。

[0122] 实施例 V 和 VIII 分别描述了蔗糖存在于不同温度保存不同时间的 SC Belatacept 和 Abatacept 药品的稳定性研究。使用稳定性 - 指示分子排阻色谱 (SE-HPLC) 测定法监测高分子量种类的增加。结果显示蔗糖的存在可以增加 SC 制剂中 CTLA4Ig 分子的稳定性。更高的蔗糖:蛋白质重量比可得到更好的稳定化效果。基于这些研究,选择以可提供最佳稳定性而不会引起 SC 溶液过高渗透性的比例的蔗糖作为稳定剂。

[0123] 可用于 SC 药品稳定化的蔗糖量为蛋白质与蔗糖重量比至少为 1 : 1,优选蛋白质与蔗糖重量比为 1 : 1.3-1 : 1.5,更优选蛋白质与蔗糖重量比约为 1 : 1.4。

[0124] 如果必要的话,加入药学可接受的酸和 / 或碱设定制剂的 pH。优选的药学可接受酸为盐酸。优选的碱为氢氧化钠。

[0125] 在制剂开发研究中,作为 pH 的函数研究 SC 药品的稳定性。实施例 V 描述了作为 pH 的函数研究 SC Belatacept 药品的稳定性。将 SC 制剂 pH 调至 7-8.2。将样品放置于稳态并使用稳定性 - 指示分子排阻色谱 (SE-HPLC) 测定法检测各时间点高分子量种类的增加。在建议保存条件 2° -8°C 下,没有观察到 HMW 种类形成速度的显著变化。

[0126] 除聚集外,脱酰胺作用为发酵、收获 / 细胞净化、纯化、药物 / 药品保存和样品分析中可能发生的肽和蛋白质的常见产品变体。脱酰胺作用为从形成可水解的琥珀酰亚胺中间体的蛋白质失去 NH₃。该琥珀酰亚胺中间体可导致母体肽的质量减少 17u。之后的水解可导致质量减少 18u。由于在含水条件下不稳定,难以纯化琥珀酰亚胺中间体。这样,由于质量增加了 1u 脱酰胺作用通常是可检测的。天冬酰胺脱酰胺作用可得到天冬氨酸或异天冬氨酸。影响脱酰胺作用速率的参数包括 pH、温度、溶剂介电常数、离子强度、一级序列、局部多肽构象和三级结构。肽链中与 Asn 相邻的氨基酸残基可影响脱酰胺速率。蛋白质序列中 Asn 之后存在 Gly 和 Ser 可使对脱酰胺作用更加敏感。

[0127] 前期的实验室规模稳定性研究表明脱酰胺作用可超过使用 pH 7.8 的 SC abatacept 制剂在 24 个月的肽作图检测方法中的参比水平。2-8°C 和 25°C,60% 湿度下的

六个月数据表明 pH 7.2 时的脱酰胺速率较低, pH 7.8 时的脱酰胺速率较高。实施例 IX 和 XII 描述了用于评价 SC 制剂在 pH 范围 6.3-7.2 的脱酰胺作用。

[0128] SC 药物制剂可接受的 pH 范围为 6-8, 优选 6-7.8, 更优选 6-7.2。

[0129] 在另一方面, 可加入至少 10mM 的盐或缓冲液组分, 优选 10-200mM。这些盐和 / 或缓冲液为药学可接受的并衍生自己知的酸 (无机的和有机的) 和“可形成碱”的金属或胺。除了磷酸盐缓冲液, 也可使用甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液及类似缓冲液, 其中钠、钾或铵离子可作为平衡离子。

[0130] 实施例 VIII 描述了缓冲液强度对 abatacept SC 药品的作用。对于 pH 7.5、浓度为 100mg/mL 的 abatacept 药品, 与 5mM 磷酸盐缓冲液相比, 10mM 磷酸盐缓冲液中的稳定性更好。而且, 10mM 磷酸盐缓冲液具有更高的缓冲能力, 与 5mM 缓冲液相比可更好地控制制剂 pH。

[0131] 本文感兴趣的含水载体为药学可接受的 (对于人体给药安全无毒) 并可用于制备液体制剂的载体。示例性载体包括无菌注射用水 (SWFI)、抑菌性注射用水 (BWFI)、pH 经缓冲的溶液 (磷酸盐缓冲生理盐水)、无菌生理盐水溶液、林格氏液或葡萄糖溶液。

[0132] 本发明制剂可任选加入防腐剂以降低细菌作用。加入防腐剂, 例如, 可有助于生产多剂量制剂。

[0133] 如在低压冻干药品中所讨论, CTLA4Ig 分子与标准注射器中的硅氧烷不相容, 其与硅氧烷反应生成可见颗粒, 因此限制了患者使用无硅氧烷注射器。SC 制剂可任选包含表面活性剂以防止硅氧烷存在下生成可见颗粒。

[0134] 实施例 V 和 VIII 分别描述了表面活性剂例如聚山梨酯 80 和帕洛沙姆 188 对 belatacept 和 abatacept 药品溶液稳定性的作用, 研究发现表面活性剂对 SC 制剂中 CTLA4Ig 分子的稳定性没有影响。评价不同水平的帕洛沙姆 188, 结果发现 4mg/ml-8mg/ml, 优选 8mg/ml 的浓度可有效防止制剂中硅氧烷相关颗粒的形成。

[0135] 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) belatacept SC 药品的典型组成如表 3 所示 表 3 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) belatacept SC 药品的组成

组分	用量 (mg/ 管形瓶) [°]
Belatacept	140.0
蔗糖	190.4
组分	用量 (mg/ 管形瓶) [°]
帕洛沙姆 188	8.96
一水合磷酸二氢钠	0.371
无水磷酸氢二钠	1.193
注射用水	适量至 1.12ml

[0136] [°] 包括 40% 过量填充用于补偿管形瓶、针头和注射器的损失。

[0137] 125mg/ml (125mg/ 管形瓶) Abatacept SC 药品的典型组成如表 4 所示 表 4 125mg/ml (125mg/ 管形瓶) Abatacept SC 药品的组成

组分	用量 (mg/ 管形瓶) ^d
Abatacept	175
蔗糖	238
帕洛沙姆 188	11.2
一水合磷酸二氢钠	0.20
无水磷酸氢二钠	1.36
注射用水	q. s. to 1.4ml

[0138] 包括 40%过量填充用于管形瓶、针头和注射器的损失。

[0139] 装入注射器中的 125mg/ml Abatacept SC 药品的典型组成如表 5 所示 表 5 125mg/ml (125mg/ 注射器) Abatacept SC 药品的组成

组分	用量 (mg/ 注射器)
Abatacept	125
蔗糖	170
帕洛沙姆 188	8.0
一水合磷酸二氢钠	0.143
无水磷酸氢二钠	0.971
注射用水	q. s. to 1. ml

[0140] SC 制剂的建议保存条件为 2-8°C, 建议保存期限为至少 12 个月。

[0141] 在环境温度下使用 Mettler-Toledo 密度计测定 abatacept SC 和匹配安慰剂的密度。用 5-mL 样品测量三份。abatacept SC 制剂的密度为 1.1g/cc, 安慰剂产品的密度为 1.065g/cc。通常 SC CTLA4Ig 制剂的密度为约 1.0g/cc- 约 1.2g/cc, 优选约 1.0g/cc- 约 1.15g/cc, 更优选约 1.095g/cc- 约 1.105g/cc。

[0142] 在环境温度下使用 Brookfield 电流计测定 abatacept SC 制剂的粘度。在测量中使用 9.3cps 的参比标准。SC 药品的粘度为 125mg/mL, abatacept 浓度为 13±2cps。通常 125mg/mL SC CTLA4Ig 制剂的粘度约 9- 约 20cps, 优选约 9- 约 15cps, 更优选 12- 约 15cps。

[0143] 使用蒸汽压方法测定 SC abatacept 药品和安慰剂制剂的摩尔渗透压浓度。数据显示浓度为 125mg/mL abatacept SC 制剂的摩尔渗透压浓度为 770±25mOsm/kgH₂O。通常 125mg/mL SC CTLA4Ig 制剂的摩尔渗透压浓度为约 250- 约 800mOsm/kgH₂O, 优选约 700- 约 800mOsm/kgH₂O, 更优选约 750- 约 800mOsm/kgH₂O。

SC 制剂的制备

[0144] SC 制剂的生产过程通常包含与糖和表面活性剂复合, 然后无菌过滤并装入管形瓶或注射器, 任选在此之前使用超滤装置对药物进行透析 (缓冲液交换) 和浓缩。

[0145] 实施例 I 和 II 分别描述了 SC Belatacept 和 Abatacept 药品的生产。

[0146] 本领域技术人员将意识到需要将容器过量填充以补偿制备和注射中管形瓶、针头和注射器的残留。例如, 每支 SC 液体制剂管形瓶含有 40%过量药品以补偿重新配制和抽取时的损失并确保可从管形瓶抽取 0.8ml 含有 100mg Belatacept 的溶液。

液体制剂

[0147] 在具体情况下, IV 制剂可能是优选的给药途径, 例如移植 手术后的住院病人通过 IV 途径接受所有的药物。本领域技术人员将认识到低压冻干制剂分别对生产者和医护人员的不利和风险。对于医护人员的不利和风险与重新配制时的污染、起泡和产品损失以及医护人员配制 IV 制剂所需要的时间相关。此外, 去除生产过程中的低压冻干步骤可降低仪器的生产损耗和员工时间。所有这些原因足以促使我们设计 IV 用途的液体制剂。

[0148] 优选的液体制剂应类似第一次配制成蛋白浓度约 25mg/ml 之后的低压冻干药品。可在使用时由医护人员用 0.9%氯化钠注射液 USP 将购买的液体制剂进一步稀释至需要的药品浓度 1-10mg/ml。被稀释的注射药品是等渗的并适于静脉输注给药。

[0149] 如上述讨论, 液体制剂的长期稳定性是蛋白质药品面临的一个问题。为了确定防

止高分子量种类形成的溶液长期稳定性,进行制剂开发研究以评价本发明液体制剂的溶液稳定性。

[0150] 本发明的液体制剂在含水载体中包含蛋白浓度至少为 20mg/ml 的 CTLA4Ig 分子与稳定化水平的糖,优选至少 25mg/ml 与稳定化水平的糖。糖的用量优选为蛋白质与糖的重量比至少为 1 : 1。糖优选双糖,最优选蔗糖。该液体制剂也可包含一种或多种选自缓冲剂、表面活性剂和防腐剂的组分。

[0151] 用于稳定化液体药品的蔗糖量为蛋白质与蔗糖的重量比至少为 1 : 1,优选蛋白质与蔗糖的重量比 1 : 2 至 1 : 10,更优选蛋白质与蔗糖的重量比约 1 : 2。

[0152] 如果必要的话,加入药学可接受的酸和 / 或碱设定制剂的 pH。优选的药学可接受的酸为盐酸。优选的碱为氢氧化钠。

[0153] 在制剂研发中,在目标 pH7.5 研究液体药品的稳定性。实施例 VII 描述了在 pH 7.5 研究液体 Belatacept 药品的稳定性。将液体制剂 pH 调至 7.5。将样品放置于稳态并使用稳定性 - 指示分子排阻色谱 (SE-HPLC) 测定法检测各时间点高分子量种类的增加。在建议保存条件 2° -8°C 下,没有观察到 HMW 种类形成速度的显著变化。

[0154] 除聚集外,脱酰胺作用和片段化为发酵、收获 / 细胞净化、纯化、药物 / 药品保存和样品分析中可能发生的肽和蛋白质的常见产品变体。前期的实验室规模稳定性研究表明脱酰胺作用会超过肽作图检测方法 (上升超过 5% T26a 或 T26b (% T30) 最大值) 中的参比水平并且片段化将超出使用保存于 2° -8°C 的 belatacept (20mg/ml 于 pH7.5) 在 24 个月的 SDS-PAGE 检测方法 (降低至主带最小值的 96% 以下) 中的参比水平。液体制剂数据 (见以上 SC 数据) 表明存在于本发明制剂中的脱酰胺作用速率随着制剂 pH 的降低而降低。

[0155] 液体药品可接受的 pH 范围为 6-8,优选 6-7.8,更优选 6-7.2。

[0156] 在另一方面,可加入至少约 10mM 的盐或缓冲液组分,优选 10-200mM。这些盐和 / 或缓冲液为药学可接受的并衍生自己知的酸 (无机的和有机的) 和 “可形成碱” 的金属或胺。除了磷酸缓冲液,也可使用甘氨酸盐、碳酸盐、柠檬酸盐缓冲液及类似缓冲液,其中钠、钾或铵离子可作为平衡离子。

[0157] 本文感兴趣的含水载体为药学可接受的 (对于人体给药安全无毒) 并可用于制备液体制剂的载体。示例性载体包括无菌注射用水 (SWFI)、抑菌性注射用水 (BWFI)、pH 经缓冲的溶液 (磷酸盐缓冲生理盐水)、无菌生理盐水溶液、林格氏液或葡萄糖溶液。

[0158] 本发明制剂可任选加入防腐剂以降低细菌作用。加入防腐剂,例如,可有助于生产多剂量制剂。

[0159] 如在低压冻干药品中所讨论,CTLA4Ig 分子与标准注射器中的硅氧烷不相容,其与硅氧烷反应生成可见颗粒,因此限制了患者使用无硅氧烷注射器。液体制剂可任选包含表面活性剂以防止硅氧烷存在下生成可见颗粒。

[0160] 20mg/ml (250mg/ 管形瓶) Belatacept 液体药品的典型组成如表 6 所示 表 6 20mg/ml (250mg/ 管形瓶) Belatacept 液体药品的组成

组分	Amount ^a (mg/ 管 形瓶)
Belatacept	260
蔗糖	520
一水合磷酸二氢钠	18.1
氯化钠	15.3

盐酸	调节至 pH 7.5
氢氧化钠	调节至 pH 7.5
注射用水	q. s. to 13ml

[0161] ^a 包括 40% 过量填充用于补偿管形瓶、针头和注射器的损失。

[0162] 液体制剂的建议保存条件为 2-8°C, 建议保存期限为至少 12 个月。

液体制剂的制备

[0163] 液体药品生产过程通常包含与糖和任选表面活性剂复合、然后无菌过滤、装入管形瓶、加塞和加盖。

[0164] 通常将已配制的总体溶液设定为固定的蛋白质浓度, 这样装入管形瓶的体积可保持恒定。在加入糖和药物时, 将混合仪速度控制在 250±50rpm 以尽量减少批溶液中的泡沫并确保糖在 10-20 分钟内完全溶解。已配制的总体溶液在填充前可于 2° -8°C 或室温日光下保存至少 24 小时。

[0165] 由于 CTLA4Ig 分子的热敏感性, 已配制的总体溶液未进行终灭菌。可使用一系列的 0.22-μm Millipore Millipak® 除菌级滤膜在装入管形瓶之前将已配制的总体溶液灭菌。

[0166] 本领域技术人员将意识到需要将容器过量填充以补偿制备和注射中管形瓶、针头和注射器的残留。例如, 每支 Belatacept 药品管形瓶为 20mg/ml (250mg/ 管形瓶), 含有 4% 过量药品以补偿重新配制和抽取时的损失。

制造品

[0167] 在本发明另一个实施方案中提供了制造品, 其包含药品并 优选提供其使用说明。制造品包含容器。适当的容器包括, 例如瓶子、管形瓶、注射器和试管。该容器可由各种材料例如玻璃、塑料或金属形成。

[0168] 该容器盛有低压冻干或液体制剂。容器上或与容器相连的标签可标明重新配制的说明和 / 或用法。例如, 该标签可标明 25mg/ml belatacept 应稀释至上述蛋白浓度。该标签可进一步标明 SC 制剂可用于或专用于皮下给药。盛有制剂的容器可为多剂量管形瓶, 其允许反复给药 (例如 2-6 次), 例如皮下制剂。或者该容器为含有例如皮下制剂的预充式注射器。

[0169] 制造品可进一步包含第二个容器, 其含有例如低压冻干制剂的适当载体。

[0170] 制造品可进一步包括从商业和使用者角度需要的其它物质, 包括其它缓冲液、稀释剂、滤膜、针头、注射器和有使用说明的包装插页。

[0171] 对于无表面活性剂的药品优选使用无硅氧烷注射器, 例如在配制低压冻干药品和 / 或将管形瓶中的溶液转移至静脉袋时, 也可与药品管形瓶一起包装。

使用方法

[0172] 本发明进一步提供了治疗免疫系统疾病或耐受性诱导的方法, 其包括给予有效量的本发明 CTLA4Ig 分子制剂。在具体实施方案中, 免疫系统疾病由 CD28- 和 / 或 CTLA4- 阳性细胞与 CD80/CD86- 阳性细胞相互作用介导。在进一步的实施方案中, T 细胞相互作用被抑制。免疫系统疾病包括但不限于自身免疫疾病、免疫增生性疾病、移植相关病症。这些方

法包括给予受试者本发明的 CTLA4Ig 分子制剂以调节 T 细胞与 CD80- 和 / 或 CD86- 阳性细胞的相互作用。移植相关疾病的实例包括移植物抗宿主疾病 (GVHD) (例如由骨髓移植或在耐受诱导中引起的疾病)、与移植物移植排斥、长期排斥和组织或细胞自身 - 或异种移植物 (包括实质器官、皮肤、岛 (islets)、肌肉、肝细胞、神经元) 相关的免疫病症。免疫增生性疾病的实例包括但是不限于牛皮癣、T 细胞淋巴瘤、T 细胞急性成淋巴细胞白血病、睾丸血管中心 T 细胞淋巴瘤、良性淋巴脉管炎和自身免疫疾病例如狼疮 (如红斑狼疮、狼疮性肾炎)、Hashimoto's 甲状腺炎、原发性粘液水肿、Graves' 病、恶性贫血、自身免疫性萎缩性胃炎、艾迪生病、糖尿病 (如胰岛素依赖型糖尿病、I 型糖尿病)、Goodpasture's 综合症、眼葡萄膜炎、多发性硬化、自身免疫性溶血性贫血、特发性血小板减少、原发性胆汁性肝硬化、慢性肝炎、溃疡性结肠炎、sjogren's 综合症、风湿性疾病 (例如风湿性关节炎)、多发性肌炎、硬皮症和混合性结缔组织病。

[0173] 本发明进一步提供了抑制受试者对实质性器官和 / 或组织移植排斥的方法, 该受试者为移植组织的接受者。通常, 在组织移植中, 对移植物的排斥是由于其被 T 细胞识别为外源性物质起始的, 然后产生可破坏该移植物的免疫应答。本发明的 CTLA4Ig 分子制剂通过抑制 T 淋巴细胞增殖和 / 或细胞因子的分泌可降低对组织的破坏并且诱导抗原 - 特异性 T 细胞无应答性使不需要全身免疫抑制即可长期接受移植物。而且本发明的 CTLA4Ig 分子制剂可与其它药物联合使用, 包括但不限于皮质激素、环孢霉素 A、雷帕霉素、麦考酚酸吗乙酯、硫唑嘌呤、他克莫司 (tacrolimus)、巴利昔单抗和 / 或其它生物制品。

[0174] 本发明也提供了抑制受试者中移植物抗宿主病的方法。该方法包括单独给予或与附加配体 (与 IL-2、IL-4 或 γ -干扰素反应) 一起给予受试者本发明制剂。例如可将本发明的 CTLA4Ig 分子 SC 制剂给予骨髓移植接受者用于抑制供体 T 细胞的同种异体反应性。或者在移植前使骨髓移植物中的供体 T- 细胞在活体外对接受者的同种异体抗原产生耐受。

[0175] 本发明 CTLA4Ig 分子制剂对 T 细胞应答的抑制也可用于治疗自身免疫病症。许多自身免疫病症是由对自身抗原具有反应性的 T 细胞的不当活化引起的, 其可促进细胞因子和自身抗体的产生, 这些均与该疾病的病理相关。给予患有或易患自身免疫疾病的受试者 CTLA4Ig 分子制剂可防止自身反应性 T 细胞的活化并可降低或消除疾病症状。这一方法也包含单独或与附加配体 (与 IL-2、IL-4 或 γ -干扰素反应) 一起给予受试者本发明制剂。

[0176] 本发明制剂最有效的给药方式和剂量方案取决于疾病的严重程度和进程、患者的健康状况和对治疗的响应性以及治疗医师的判断。依据本发明的实践, 治疗患者的有效剂量为约 0.1- 约 10mg/ 受试者公斤体重。而且, 有效量也可约为 1- 约 10mg/kg 受试者公斤体重。

[0177] 可给予受试者足以阻断内源性 B7 (例如 CD80 和 / 或 CD86) 分子与它们各自的配体在受试者体内结合的时间和量 (例如一段时间或多次) 的本发明 CTLA4Ig 分子制剂。阻断内源性 B7/ 配体的结合可由此抑制 B7- 阳性细胞 (例如 CD80- 和 / 或 CD86- 阳性细胞) 与 CD28- 和 / 或 CTLA4- 阳性细胞的相互作用。CTLA4Ig 分子的剂量取决于许多因素, 包括但不限于受累组织类型、被治疗疾病的类型、疾病的严重程度、受试者的健康状况和受试者对治疗药剂的反应性。因此, 药物剂量可因受试者和给药方式而变化。美国专利申请美国公开号 US2003/0083246 和美国专利申请美国公开号 US2004/0022787 描述了具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的治疗风湿性疾病 (例如风湿性关节炎) 的 CTLA4Ig 的剂量和给药

方案。全部并于本文作为参考。

[0178] 可根据需要每日、每周、每月和 / 或每年以每小时 / 天 / 周 / 月 / 年单次或多次给予受试者有效量的 CTLA4Ig 分子。例如, 在一个实施方案中, 可起初每两周给予一次有效量的 CTLA4Ig 分子, 持续一个月, 然后每月给予一次。

[0179] CTLA4Ig 分子的有效量可为约 0.1-100mg/ 受试者公斤体重。在一个实施方案中, 有效量为约 0.1-20mg/ 受试者公斤体重。在另一个实施方案中, CTLA4Ig 分子的有效量可为约 2mg/ 受试者公斤体重。在另一个实施方案中, CTLA4Ig 分子的有效量可为约 10mg/ 受试者公斤体重。在另一个实施方案中, 对于体重少于 60kg 的受试者, CTLA4Ig 分子的有效量为 500mg, 对于体重在 60-100kg 的受试者为 750mg, 体重大于 100kg 为 1000mg。

[0180] 2005 年 4 月 6 日申请的美国专利申请序列号 60/668774 和 2006 年 4 月 6 日申请的美国专利申请序列号 11/399666 描述了具有 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列用于治疗移植植物移植相关免疫病症的 LEA29YIg 的剂量和给药方案。全部并于本文作为参考。

[0181] 通常本发明的 CTLA4Ig 分子制剂的剂量基于体重, 可由目标谷血清浓度曲线决定给药方案。通常本发明 LEA29YIg 分子在移植后的前 3 个月至 6 个月约 $3 \mu\text{g/mL}$ - 约 $30 \mu\text{g/mL}$ 的目标谷血清浓度足以维持同种异体移植物的功能, 优选约 $5 \mu\text{g/mL}$ - 约 $20 \mu\text{g/mL}$ 。通常在维持阶段本发明 LEA29YIg 分子的目标谷血清浓度为约 $0.2 \mu\text{g/mL}$ - 约 $3 \mu\text{g/mL}$, 优选约 $0.25 \mu\text{g/mL}$ - 约 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 。

[0182] 可以约 0.1- 约 20.0mg/ 公斤患者体重的量给予本发明 LEA29YIg 分子, 通常为约 1.0 至 -15.0mg/kg。例如, 可在早期和移植后的高风险期以 10mg/ 患者公斤体重给予 L104EA29YIg, 然后降低至 5mg/ 患者公斤体重作为维持剂量。

[0183] 可通过 30 分钟或 1 小时或更长时间的静脉输注给予本发明的 CTLA4Ig 分子。或者通过单次或多次皮下注射给予所需剂量。通常在治疗早期当病人住院治疗和 / 或定期就诊以便监控时使用 30 分钟静脉输注的给药方式。皮下注射通常为维持阶段使用的给药方式, 这样可减少医护人员静脉输注, 使患者可以回归日常生活。

[0184] 实施例 10 描述了低压冻干 IV CTLA4Ig 制剂在健康受试者和风湿性关节炎 (RA) 患者中的药物代谢动力学。RA 患者和健康受试者中 abatacept 的药物代谢动力学具有可比性。在 RA 患者中, 多次静脉输注之后, abatacept 的药物代谢动力学显示在剂量范围 2 mg/kg-10mg/kg 内 $C_{\max}$ 和 AUC 成比例增加。10mg/kg 时, 血清浓度在 60 天达到稳态, 平均 (范围) 谷浓度为 24mcg/mL (从约 1- 约 66mcg/mL)。10mg/kg 每月间隔对 RA 患者进行持续重复治疗并未发现 abatacept 的全身积累。

[0185] 通过以下实施例可更好地理解本发明。但是它们并不限制本发明的范围。公开中的所有引用均并于本文作为参考。

实施例 I

[0186] 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) Belatacept SC 药品被配制成无菌、无热源、随时可用的适用于皮下给药的溶液。

[0187] 生产 2.2kg 规模 (1500 管形瓶) 的 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) Belatacept SC 药品。批产品配方如表 7 所示。表 7 代表性批产品配方

组分	每批用量 (g)
Belatacept 药物 ^b	250.0
蔗糖	340.0
帕洛沙姆 188	16.0
一水合磷酸二氢钠	0.662
无水磷酸氢二钠	2.13
注射用水	适量至 2.2kg
总批量 (kg)	2.2kg ^a

[0188] ^a 总批量 2.2kg (2-L)。容液密度为 1.10g/ml (20° -25°C) ^bBelatacept 药物: 蛋白浓度 25mg/ml, 25mM 磷酸钠, 10mM 氯化钠, pH 为 7.5, < 5% HMW 种类

[0189] 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) Belatacept SC 药品的生产过程包括将总体药物的缓冲液从 pH 7.5 的 25mM 磷酸钠、10mM 氯化钠缓冲液交换至 pH 7.5 的 10mM 磷酸钠缓冲液, 然后去除缓冲液将蛋白从约 25mg/ml 浓缩至约 150mg/ml。将总体药物在新的 10mM 磷酸钠 pH 7.5 的缓冲液中透析 5 次完成缓冲液交换, 然后去除缓冲液将蛋白浓缩至 ~ 150mg/ml。在不锈钢 Pellicon 微型过滤器架 (Millipore) 的加料口、滞留口和渗透口上安装不锈钢压力计和薄膜阀。使用 Pellicon mini module 的两个过滤盒安装了 0.1m² 面积的 Biomax 聚醚砜膜, 其截留限度为 30kDa 标示分子量。根据生产商的建议安装过滤盒。药物加料容器为具有磁性搅拌棒的 4L 玻璃容器。用 MasterFlex 高效硅酮管连接容器和滤器以及渗透管线。由安装在加料管线上的蠕动泵进料。然后将蔗糖和帕洛沙姆 188 溶解至浓缩蛋白溶液中并用 pH 7.5 的 10mM 磷酸钠缓冲液调节终批产品重量。用 0.22 微米的除菌滤器过滤总体溶液并装入已灭菌并去除热源的 5-cc I 型火石玻璃管形瓶中, 加塞 20mm 的橡胶塞并用 20mm 铝塑易拉盖密封。125mg/ml (100mg/ 管形瓶) Belatacept SC 药品的组成如表 8 所示。表 8 125mg/ml (100mg/ 管形瓶) Belatacept SC 药品组成

组分	量 (mg/ 管形瓶) ^e
Belatacept	140.0
蔗糖	190.4
帕洛沙姆 188	8.96
一水合磷酸二氢钠	0.371
无水磷酸氢二钠	1.193
注射用水	适量至 1.12ml

[0190] ^e 包括 40% 过量填充用于管形瓶、针头和注射器损失

实施例 II

[0191] 将 125mg/ml (125mg/ 管形瓶) Abatacept SC 药品配制成无菌、无热源、随时可用的适用于皮下给药的溶液。生产一批 5L 规模 (3500 管形瓶) 的 125mg/ml (125mg/ 管形瓶) Abatacept SC 药品。批产品处方如表 9 所示。表 9 批产品处方

组分	用量 (gm)
Abatacept 药物 ^a	625
组分	用量 (gm)
蔗糖	850
帕洛沙姆 188	40
一水合磷酸二氢钠	0.715
无水磷酸氢二钠	4.86
注射用水	适量至 5.0L
总批量 (L)	5.0

[0192] ^aAbatacept 药物:蛋白质浓度 50mg/ml, 25mM 磷酸钠, 50mM 氯化钠, pH 7.5, < 5% HMW 种类

[0193] 如实施例 I 所述, Abatacept SC 的生产过程包括将总体药物的缓冲液从 pH 7.5 的 25mM 磷酸钠、50mM 氯化钠缓冲液交换至 pH 7.5 的 10mM 磷酸钠缓冲液, 然后去除缓冲液将蛋白质从约 50mg/ml 浓缩至约 150mg/ml。然后将蔗糖和帕洛沙姆 188 溶解至浓缩蛋白溶液中并用 pH 7.8 的 10mM 磷酸钠缓冲液调节终批产品重量。用 0.22 微米的除菌滤器过滤总体溶液并装入已灭菌并去热源的 5-ccI 型火石玻璃管形瓶中, 加塞 20mm 的橡胶塞并用 20mm 铝塑易拉盖密封。

[0194] 125mg/ml (125mg/管形瓶) Abatacept SC 药品的组成如表 10 所示。表 10 125mg/ml (125mg/管形瓶) Abatacept SC 药品的组成

组分	用量 (mg/管形瓶) ^f
Abatacept	175
蔗糖	238
帕洛沙姆 188	11.2
一水合磷酸二氢钠	0.20
无水磷酸氢二钠	1.36
注射用水	适量至 1.4ml

[0195] ^e 包括 40% 过量填充用于管形瓶、针头和注射器损失

实施例 III

[0196] 低压冻干 Abatacept (250mg/管形瓶) 药品为无菌、无热源的 适用于静脉 (IV) 给药的亲液物。每支一次性管形瓶包含 250mg abatacept, 可在使用时用无菌注射用水 USP 配制并用 0.9% 氯化钠注射液稀释。

[0197] 115 升批量的批产品处方如表 11 所示 表 11 批产品处方

组分	用量 (kg)
Abatacept 药物 ^a	4.6
一水合麦芽糖	9.2
盐酸	调节至 pH 7.5
氢氧化钠	调节至 pH 7.5
注射用水	适量至 119.6 ^b

[0198] ^aabatacept 药物:蛋白质浓度 50mg/ml, 25mM 磷酸钠, 50mM 氯化钠, pH 7.5, < 5% HMW 种类 ^b 已配制总体溶液密度 = 约 1.04g/ml

[0199] 将所需量的 abatacept 药物加入干净灭菌并安装了搅拌器的不锈钢混合仪中。250±50rpm 搅拌药物溶液并同时保持溶液温度在 5° -25°C。

[0200] 将所需量的一水合麦芽糖粉末加入混合仪中。于 15° -25°C 将溶液混合至少 10 分钟。

[0201] 将溶液 pH 调节至 7.3-7.7, 如果必要的话使用之前制备的 1N 氢氧化钠溶液或 1N 盐酸溶液。用注射用水 USP 将该批产品调节至终批产品重量 (最终适量加至) 并至少混合 8 分钟。取样已配制的总体溶液检测 pH。

[0202] 用 0.45-μm 滤膜预过滤已配制的总体溶液。取样 0.45-μm 滤膜过滤后的已配制总体溶液并检测微生物负载和细菌内毒素 (BET)。

[0203] 在填充之前用一系列的 0.22-μm 滤膜将预过滤的已配制总体溶液无菌过滤。

[0204] 将无菌过滤的已配制总体溶液填充并用 20nm-Daikyo 灰色丁基胶塞由全自动填充 / 加塞机器加半塞。将 15-cc I 型管状玻璃管形瓶清洗、灭菌 / 去热源。

[0205] 将已填充和加半塞的药品管形瓶低压冻干。Abatacept 药品低压冻干过程中使用的冷冻干燥周期摘要如表 12 所示。表 12 abatacept 药品的冷冻干燥周期

工艺参数	工艺控制
填充温度	5±3℃
冷冻（上架斜面 (Shelf Ramp)）	2.5 小时内从 5℃至 -45℃
冷冻	-45±3℃保持 4 小时
初次干燥（上架斜面 (Shelf Ramp)）	2 小时内从 -45℃至 -19℃
初次干燥（真空）	100±20 微米
初次干燥	-19±2℃保持 84 小时
中间干燥（上架斜面 (Shelf Ramp)）	2 小时内从 -19℃至 0℃
中间干燥	0±3℃保持 8 小时
二次干燥（上架斜面 (Shelf Ramp)）	2.5 小时内从 0℃至 30℃
二次干燥（真空）	100±20 微米
二次干燥	30℃保持 12 小时
加塞	30±3℃
加塞（真空）	500±100 微米
卸载前保存	20±3℃保持至少 4 小时

[0206] 低压冻干周期结束时,用经无菌过滤的氮气将室内压力上升至 500 微米并在真空中进行管形瓶加塞。已加塞的管形瓶仍在冷冻干燥器内部并至少保持 4 小时。用 20-mm 铝质白色易拉盖在经 HEPA 过滤的空气中用加盖机器密封低压冻干并加塞的管形瓶。用外部管形瓶清洗器和去离子水清洗已密封的管形瓶。将已清洗的药品管形瓶保存于 2-8℃。

[0207] 低压冻干 abatacept (250mg/ 管形瓶) 药品的组成如表 13 所示。表 13 abatacept (250mg/ 管形瓶) 药品的组成

组分	用量 (mg/ 管形瓶) ^a
Abatacept	262.5
一水合麦芽糖	525
一水合磷酸二氢钠 ^b	18.1
氯化钠 ^b	15.3
盐酸	调节至 7.5
氢氧化钠	调节至 7.5

[0208] ^a 包括 5% 过量填充用于管形瓶、针头和注射器的损失 ^b 这些组分存在与 abatacept 药物溶液中

实施例 IV

[0209] 低压冻干 Belatacept (100mg/ 管形瓶) 药品为无菌、无热源、适用于静脉 (IV) 给药的亲液物。每支一次性管形瓶含有 100mg belatacept, 其可用 4.2ml 无菌注射用水 USP 配制成浓度为 25mg/ml 的溶液。可在使用时用 5% 葡萄糖注射液 USP 或 0.9% 氯化钠注射液 USP 将其浓度进一步稀释低至 1mg/ml。

[0210] 药品生产的批量可从 20 升至 120 升不等。66 升 (12,000 管形瓶) 批量的代表性批产品处方如表 14 所示。表 14 66 升 (12000 管形瓶) 批量的批产品处方

组分	用量 (kg)
Belatacept 药物 ^a	1.32
蔗糖, 高纯度, 低内毒素	2.64
一水合磷酸二氢钠	0.18

氯化钠	0.03
1N 氢氧化钠 / 或 1N 盐酸	调节至 7.5
注射用水	适量至批产品重量

[0211] ^aBelatacept 药品：蛋白质浓度 25mg/ml，25mM 磷酸钠，10mM 氯化钠，pH 7.5，< 5% HMW 种类

[0212] 如实施例 III 所述生产 Belatacept 低压冻干药品

[0213] 100mg/ 管形瓶低压冻干 Belatacept 药品的组成如表 15 所示。表 15 100mg/ 管形瓶低压冻干 Belatacept 药品的组成

组分	用量 / 管形瓶 (mg)
Belatacept	110 ^a
蔗糖, 高纯度, 低内毒素	220
一水合磷酸二氢钠	15.18
氯化钠	2.55
1N 氢氧化钠	调节至 pH 7.5
1N 盐酸	调节至 pH 7.5

[0214] ^a 每支管形瓶包含 10% 过量填充用于管形瓶、针头和注射器中重新配制溶液的残留。

实施例 V

[0215] 将制剂于稳态于不同温度下放置不同时间进行 Belatacept 药品 SC 液体制剂的稳定性研究。

蔗糖的作用

[0216] 制剂开发研究用于评价不同水平的蔗糖对 belatacept 药品溶液稳定性的作用。将样品放置于 -70°C、8°C 和 25°C，60% 湿度的条件下并在不同时间点检测。测定的蛋白质与蔗糖比为 1 : 1、1 : 1.7 和 1 : 1.75。用 belatacept 高分子量 (HMW) 种类的形成测定溶液中的蛋白质稳定性。结果如表 16 所示。表 16 不同蔗糖水平对 100mg/ml belatacept 药品的作用

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类			
		对照 ^a	1:1	1:1.75	1:1.7
起始	0	1.11	1.07	1.05	1.06
-70°C	3	1.18	1.09	1.07	1.09
8°C	1	1.22	1.10	1.08	1.07
	2	1.34	1.15	1.08	1.09

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类			
		对照 ^a	1:1	1:1.75	1:1.7
	3	NA	1.24	1.15	1.17
	6	1.78	1.39	1.23	1.24
	9	2.02	1.53	1.34	1.34
	12	2.06	1.49	1.26	1.24
25°C/60%RH	0	1.11	1.07	1.05	1.06
	1	2.73	1.83	1.48	1.56
	2	3.98	2.41	1.84	1.87
	3	4.88	3.02	NA	2.23
	6	7.44	4.56	3.21	NA

^a 10mM 磷酸钠缓冲液中的 Belatacept 药品, 100mg/ml, pH 7.5

[0217] 研究结果表明增加蔗糖与蛋白质的比例可以提高蛋白质稳定性。选择 1 : 1.36(wt. : wt.) 的蛋白质与蔗糖比例用于开发 SC 溶液, 因为它可提供最佳稳定性而不会引起药品的过度高渗。

表面活性剂的作用

[0218] 评价已上市产品中各种表面活性剂例如聚山梨酯 80 和帕洛沙姆 188 对 belatacept 药品溶液稳定性的作用。在终制剂浓度 4、6 和 8mg/ml 的水平评价帕洛沙姆 188, 在 1 和 2mg/ml 评价聚山梨酯 80。将样品放置于 -70°C、8°C 和 25°C /60%湿度的条件下并在不同时间点检测。结果如表 17 所示。表 17 不同水平和类型的表面活性剂对 belatacept 药品 (100mg/ml) 的作用

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类					
		对照 ^a	帕洛沙姆 188 mg/ml			聚山梨酯 80 mg/ml	
			4	6	8	1	2
起始	0	1.11	1.06	1.07	1.07	1.08	1.08
-70°C	3	1.18	1.09	NA	1.09	1.11	1.15
8°C	1	1.22	1.10	1.08	1.09	1.10	1.12
	2	1.34	1.09	1.10	1.11	1.12	1.12
	3	NA	1.19	1.18	1.18	1.21	1.28
	6	1.78	1.27	1.23	1.25	1.29	1.30
	9	2.02	1.34	1.33	1.34	1.42	1.40
	12	2.06	1.28	1.25	1.27	1.38	1.36

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类					
		对照 ^a	帕洛沙姆 188 mg/ml			聚山梨酯 80 mg/ml	
			4	6	8	1	2
25°C/60%RH	0	1.11	1.06	1.07	1.07	1.08	1.08
	1	2.73	1.52	1.52	1.52	1.55	1.55
	2	3.98	1.91	1.89	1.89	1.99	1.97
	3	4.88	2.31	2.29	2.24	2.56	2.50
	6	7.44	3.39	4.05	NA	3.89	3.90

^a 蛋白质：蔗糖 (1 : 1.7), 100mg/ml, pH 7.5

[0219] 表面活性剂作用的研究结果表明表面活性剂对 belatacept 药品溶液的稳定性不具有显著作用。在被评价的帕洛沙姆 188 浓度中,发现 8mg/ml 的浓度足以防止制剂中硅氧烷相关颗粒的形成。

pH 的作用

[0220] 作为 pH 的函数评价 Belatacept SC(125mg/ml, 蛋白质：蔗糖 1 : 1.36, 8mg/ml Pluronic F68) 药品的稳定性。用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将溶液 pH 调至 7-8.2。将样品放置于 2° -8°C 和 25°C /60% RH 的条件下并在不同时间点检测。分析检测包括 pH 和 SE-HPLC 以监测高分子量 (HMW) 种类的增加。结果汇总于表 18。表 18 pH 对 Belatacept SC 药品*的作用

条件	时间/ 月	% 高分子量种类			
		pH 7.0	pH 7.4	pH 7.8	pH 8.2
起始	0	1.31	1.18	1.16	1.28
2-8°C	1	1.34	1.23	1.25	1.44
	2	1.42	1.29	1.31	1.56
	3	1.48	1.35	1.36	1.59
25°C/60%RH	1	2.09	2.62	2.13	2.52
	2	7.04	5.68	5.89	6.40
	3	9.98	6.13	NA	7.81

* 蛋白质：蔗糖 (1 : 1.36), 125mg/ml, +8mg/ml Pluronic F68

[0221] 在 2-8°C 的建议保存条件下没有观察到 HMW 种类形成速率的显著变化。此外,溶液态稳定性数据显示最大稳定性的 pH 为 7- 8。基于这一点,本制剂选择 pH 范围 7-8, 目标 pH 7.5。

摩尔渗透压浓度

[0222] 使用蒸汽压方法测定不同缓冲液中不同蛋白质浓度下和来自制剂过程各独立步骤中的 belatacept 药品的摩尔渗透压浓度。结果汇总于表 19。表 19 不同缓冲液和浓度中 belatacept 药品的摩尔渗透压浓度测定

Belatacept/ 缓冲液 / 赋形 剂	蛋白质浓 度 (mg/ml)	磷酸钠	氯化钠	摩尔渗透 压浓度 (mOsm/kg)
Belatacept API	25	25mM	10mM	89
Belatacept, 透析过滤步 骤	25	10mM	-	40
Belatacept 透析过滤 / 浓 缩步骤	138	10mM	-	58
Belatacept 水溶液	25	-	-	17
Belatacept 水溶液	100	-	-	27
Belatacept : 蔗糖 (1 : 1)	100	10mM	-	424
Belatacept : 蔗糖 (1 : 1.7)	100	10mM	-	737
Belatacept : 蔗糖 (1 : 1.75)	100	10mM	-	769
Belatacept : 蔗糖 (1 : 2)	100	10mM	-	870
Belatacept : 蔗糖 (1 : 1.36)	125	10mM	-	770

搅拌 / 振摇的作用

[0223] 测定搅拌对 100mg/ml 和 125mg/ml 浓度的 belatacept SC 药品溶液稳定性的作用。将含有约 1ml 的溶液的等分试样于 5cc 的试管中在 2-8℃ 以腕臂式振荡器 (wrist arm shaker) 的第 3 级速度振摇。将振荡器放置于冷室中使其温度保持在 2-8℃。以适当时间间隔取样并检测 pH 和外观, 振摇 30 天后测定相同时间样品的生物活性。

[0224] 以 100mg/ml 和 125mg/ml 的浓度于 2-8℃ 振摇 30 天的样品没有显示出 HMW 种类水平、SDS-PAGE 曲线、肽图谱、B7 结合测定、pH、外观或蛋白质浓度的变化。

多次冷冻 / 融化的作用

[0225] 研究 pH 范围 7.0-8.2 的样品中多次冷冻和融化对 belataceptSC 药品制剂稳定性的作用。将 pH 7.0、7.4、7.8 和 8.2 的 belataceptSC 药品制剂 (125mg/ml) 的约 10 μl 等分试样置于 30ml NalgenePETG 容器中。将管形瓶保存于 -70℃ 然后于室温 (25℃) 下融化 10 分钟进行多次冷冻和融化。将该周期重复 5 天。每一冷冻 / 融化周期之后分析管形瓶内容物的 pH、% HMW 种类和外观。

[0226] 在五次冷冻 / 融化循环后没有观察到样品 pH、外观或 % 高分子量种类的变化。

建议保存条件

[0227] 100mg/ 管形瓶 (125mg/ml) belatacept SC 药品的建议保存条件为 2-8℃, 建议保存期限为 12 个月。

注射器 - 性能研究

[0228] 用保存于 2° -8℃ 的 belatacept SC 药品 (125mg/ml) 研究注射器性能。评价 1ml 和 0.5mL 注射器的不同针头大小。注射器填充时间和给药压力记录于表 20 中。表 20 125mg/ml belatacept SC 药品于 2° -8℃ 的注射器性能研究

注射器容量	针头大小	填充时间 (Sec)	给药压力
1mL	27G 1/2"	25	中等
1mL 桩撑针头 (staked needle) (胰岛素)	28G 1/2"	52	中等
1mL 桩撑针头 (staked needle) (胰岛素)	29G 1/2"	50	中等
0.5mL 桩撑针头 (staked needle) (胰岛素)	30G	42 (1mL 为 94)	高

[0229] 基于表 20 所示注射器性能研究结果建议使用 21 号 x 1 1/2 英寸无菌皮下注射针从管形瓶中抽取该产品, 之后给药用 27 号 x 1/2 英寸针头。

实施例 VI

[0230] 将制剂于稳定状态于不同温度放置不同时间进行 Abatacept 药品低压冻干制剂的稳定性研究。

麦芽糖的作用

[0231] 进行制剂开发研究以评价不同水平的麦芽糖对 Abatacept 药品稳定性的作用。将样品于稳定状态放置于 50℃ 并在不同时间点监测。测定的蛋白质与麦芽糖的比例为 1 : 1、1 : 2 和 1 : 5。用 Abatacept 的高分子量 (HMW) 种类的形成测定固态蛋白质稳定性。结

果如表 21 所示。表 21 50℃下麦芽糖对 Abatacept 药品冷冻干燥固态稳定性的作用

时间(周)	SE-HPLC 测定的高分子量种类水平 (面积%)			
	不含麦芽糖	药物与麦芽糖的重量比		
		1:1	1:2	1:5a
起始	0,9	0.7	0.6	2.0
2	5,4	3.7	2.0	NA
4	8.0	5.9	2.7	2.4
6	10.2	6.8	3.3	NA
8	11.7	7.5	3.9	2.9

^a 在对药物含量 50mg/ 管形瓶的早期研发中评价药物与麦芽糖重量比例为 1 : 5 时的药品稳定性。本研究使用的药物批次与用于得到本表格其它结果的批次不同。这是这些样品中高分子量种类具有不同起始水平的原因。

[0232] 结果显示麦芽糖存在下冷冻干燥固态形式的 abatacept 药品的稳定性被提高。此外,用于稳定化 abatacept 的麦芽糖最小量经确定为:蛋白质与麦芽糖的重量比为 1 : 2。
pH 的作用

[0233] 作为 pH 的函数评价 Abatacept (250mg/ 管形瓶, 蛋白质: 麦芽糖 1 : 2) 药品的稳定性。用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸将溶液 pH 调至 6-8。将样品放置于 2° -8℃ 的条件下并在不同时间点监测。分析检测包括 pH 和 SE-HPLC 以监测高分子量 (HMW) 种类的增加。结果汇总于表 22。表 22 pH 对高分子量 (HMW) 种类形成速率的作用

时间(月)	不同 pH 值下 SE-HPLC 测定的 HMW 种类水平(面积%)				
	6.0 ^a	6.5 ^a	7.0	7.5	8.0
起始	0.6	0.6	2.0	2.0	2.0
1	0,5	0.6	2,0	2.0	2.0
2	0.7	0.7	2.0	2,0	2.0
3	0,7	0.7	2.1	2.1	2.1
6	NA	NA	1.8	1.7	1.8
12	0.8	0.8	1.9	1.8	1.9

^a 用于 pH 6.0 和 6.5 样品的药物批次与用于 7.0、7.5 和 8.0 的批次不同。这是这些样品中高分子量种类具有不同起始水平的原因。

[0234] 在 2-8℃ 的建议保存条件下没有观察到 HMW 种类形成速率的显著变化。此外,初期研发中产生的溶液态稳定性数据显示最大稳定性的 pH 为 7-8。

实施例 VII

[0235] 将制剂于稳态下于不同温度放置不同时间进行 belatacept (20mg/ml) 药品的液体制剂稳定性研究。

蔗糖的作用

[0236] 进行制剂开发研究以评价不同水平的蔗糖对 20mg/ml belatacept 液体药品溶液稳定性的作用。将样品置于稳态、8℃和 25℃ /60%湿度的条件下并在不同时间点监测。20mg/mL belatacept 中测定的蛋白质与蔗糖比为 1 : 1、1 : 2、1 : 5 和 1 : 10。用 belatacept 高分子量 (HMW) 种类的形成测定溶液中的蛋白质稳定性。这些研究的结果汇总于表 23。表 23 不同水平的蔗糖对液体 20mg/ml belatacept 药品的作用

条件	时间/ 月	% 高分子量种类			
		1:1	1:2	1:5	1:10
起始	0	0.37	0.37	0.39	0.37
8 °C	1	0.39	0.39	0.38	0.36
	2	0.40	0.41	0.38	0.37
	3	0.43	0.39	0.36	0.36
	4	0.44	0.42	0.40	0.37
	6	0.58	0.47	0.41	0.39
	9	0.54	0.45	0.42	0.39
	12	0.52	0.45	0.44	0.51
25°C/60%RH	1	0.61	0.62	0.66	0.50
	2	1.25	0.99	0.58	0.53
	3	1.40	1.00	0.80	0.57
	4	1.72	1.40	1.10	0.74
	6	4.29	2.70	2.09	1.18
	9	—*	5.59	4.15	2.33
30°C/60%RH	0.5	1.13	0.91	0.75	0.54
	1	1.77	2.03	1.25	0.84
	2	3.01	2.90	1.78	1.10
	3	4.32	11.24	5.55	1.75

* 由于蒸发样品不可用于分析

[0237] 研究结果表明增加蔗糖与蛋白质的比例可以提高蛋白质稳定性。选择 1 : 2 (wt. : wt.) 的蛋白质与蔗糖比例用于开发液体溶液,因为它可提供最佳稳定性而不会引起药品的过度高渗。

稳定性研究

[0238] 制备 3 批液体 belatacept 并置于稳态、2-8℃和 25℃ /60% RH 的条件下并在不同时间点监测。测定的蛋白质与蔗糖的重量比为 1 : 2。用 belatacept 高分子量 (HMW) 种类的形成测定液体制剂中的蛋白质稳定性。稳定性数据总结于表 24 中。表 24 液体 belatacept 产品的稳定性

条件	时间 月	Belatacept 药 物 (25 mg/mL) 对照	蛋白质:蔗糖 (1:2), 20 mg/mL pH 7.5 % HMW 种类		
			批次 1	批次 2	批次 3
起始	0	0.40	0.37	0.43	0.91
5°C	1	0.44	0.39	0.45	0.90
	2	0.47	0.41	0.46	0.90
	3	0.47	0.39	0.62	0.91
	4	0.54	0.42	NA	0.92
	6	0.63	0.47	0.57	0.94
	9	0.64	0.45	0.51	1.0
	12	0.64	0.45	0.56	NA
25°C/60% RH	1	0.61	0.62	0.60	1.04
	2	1.25	0.99	0.90	1.23
	3	1.40	1.00	1.18	1.53
	4	1.72	1.40	1.60	1.79
	6	4.29	2.70	3.09	2.44

[0239] 数据表明于 2-8°C 保存 12 个月的液体制剂中高分子量种类增加了 0.1% 而不含蔗糖的 Belatacept 药物中增加了 0.2%。结果也表明加入蔗糖有助于降低高分子量种类的形成。

实施例 VIII

[0240] 将制剂置于稳态于不同温度下放置不同时间进行 Abatacept 药品 SC 制剂的稳定性研究。

缓冲液强度的作用

[0241] 作为缓冲液强度的函数评价 SC Abatacept 药品 (100mg/ml) 的稳定性。缓冲体系可为 5 或 10mM 磷酸盐缓冲液。将样品放置于 2-8°C 和 30°C /60% RH 的条件下并在不同时间点监测。分析检测包括 pH 和 SE-HPLC 监测高分子量 (HMW) 种类的形成。结果汇总于表 25。表 25 缓冲液强度对 Abatacept 药品 (100mg/ml, pH7.5) 的作用

保存条件	时间/	% 高分子量种类
------	-----	----------

		于 10 mM 磷酸 盐缓冲液	于 5mM 磷酸 盐缓冲液
起始	0	1.30	1.47
2-8°C	1	1.49	1.74
	2	1.60	1.98
	3	1.73	2.23
30°C/60%RH	0	1.30	1.47
	0.5	8.73	14.39
	1	14.63	23.24
	2	25.26	32.25

[0242] 对于 pH 7.5、浓度为 100mg/mL 的 abatacept 药品,与 5mM 磷酸盐缓冲液相比,10mM 磷酸盐缓冲液中的稳定性更好。而且,10mM 磷酸盐缓冲液具有更高的缓冲能力,与 5mM 缓冲液相比可更好地控制制剂 pH。根据这些数据,10mM 磷酸盐缓冲液选用于制剂开发。

糖的作用

[0243] 制剂开发研究用于评价不同的糖对 abatacept SC 药品溶液稳定性的作用。将样品放置于 2-8°C 和 30°C /60%湿度的条件下并在不同时间点监测。被评价的糖为蔗糖、海藻糖和甘露醇。用高分子量 (HMW) 种类的形成测定溶液中的蛋白质稳定性。结果如表 26 所示。表 26 不同的糖对 100mg/ml, pH 7.5 abatacept SC 药品的作用

保存条件	时间/ 月	%高分子量种类			
		对照 ^a	1:1 蔗糖	1:1 海藻糖	1:1 甘露醇 ^b
起始	0	1.30	1.18	1.20	1.20
2-8°C	1	1.49	1.37	1.38	1.25
	2	1.60	1.40	1.41	1.26
	3	1.73	1.45	1.48	1.60
	6	2.10	1.54	N/A	N/A
	11.5	2.57	N/A	N/A	N/A
30°C/60%RH	0	1.30	1.18	1.20	1.30

保存条件	时间/ 月	%高分子量种类			
		对照 ^a	1:1 蔗糖	1:1 海藻糖	1:1 甘露醇 ^b
	0.5	8.73	4.31	4.34	3.59
	1	14.63	7.20	8.09	5.72
	2	25.26	11.97	14.21	10.14

^a 10mM 磷酸钠缓冲液中的 Abatacept 药品,100mg/ml, pH 7.5. ^b pH 7.8 的甘露醇制剂

[0244] 结果显示与不含糖的对照相比三种糖:蔗糖、海藻糖和甘露醇均可提供更好的 abatacept 稳定性。在 30°C 加速条件下的研究结果显示与蔗糖和海藻糖相比甘露醇可提供

更好的 abatacept 稳定性。蔗糖略好于海藻糖。在冷冻状态下,三种糖的稳定化作用没有显著差异。选择蔗糖作为制剂中的糖,因为甘露醇制剂的张力是蔗糖制剂的 2 倍。选择蔗糖用于稳定化作用将允许加入两倍量的蔗糖以达到和相同比例的甘露醇相同的张力但是抗聚集的稳定化作用更强。选择蛋白质:蔗糖为 1 : 1.36(wt. : wt.) 的比例用于研发 SC 药品,因为其可提供最佳稳定性而不会引起药品的过度高渗透性。

蔗糖的作用

[0245] 制剂开发研究用于评价不同水平的蔗糖对 Abatacept SC 药品溶液稳定性的作用。将样品放置于 2-8°C 和 30°C /60%湿度的条件下并在不同时间点监测。测定的蛋白质与蔗糖比为 1 : 1 和 1 : 2。用 Abatacept 高分子量 (HMW) 种类的形成测定溶液中的蛋白质稳定性。结果如表 27 所示。表 27 不同水平的蔗糖对 Abatacept SC 药品的作用

保存条件	时间/ 月	%高分子量种类		
		对照 ^a	1:1	1:2
起始	0	1.30	1.18	1.17
2-8°C	1	1.49	1.37	1.33
	2	1.60	1.40	1.21
	3	1.73	1.45	1.23

保存条件	时间/ 月	%高分子量种类		
		对照 ^a	1:1	1:2
	6	2.10	1.54	1.29
	11.5	2.57	N/A	N/A
30°C/60%RH	0	1.30	1.18	1.17
	0.5	8.73	4.31	2.41
	1	14.63	7.20	3.69
	2	25.26	11.97	6.59

^a10mM 磷酸钠缓冲液中的 Abatacept 药品,100mg/ml, pH 7.5.

[0246] 研究结果表明增加蔗糖与蛋白质的比例可以提高蛋白质稳定性。选择 1 : 1.36(wt. : wt.) 的蛋白质与蔗糖比例用于研发 RTU 溶液,因为它可提供最佳稳定性而不会引起药品的过度高渗透性。

表面活性剂的作用

[0247] 评价已上市产品中各种表面活性剂例如聚山梨酯 80 (Tween®80) 和帕洛沙姆 188 (Pluronic®F68) 对 abatacept SC 药品溶液稳定性的作用。在 4 和 8mg/ml 水平评价帕洛沙姆 188,在终制剂浓度 1 和 2mg/ml 评价聚山梨酯 80。将样品放置于 2-8°C 和 25°C /60%湿度的条件下并在不同时间点监测。结果如表 28 所示。表 28 不同水平和类型的表面活性剂对 abatacept SC 药品 (125mg/ml) 的作用

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类				
		对照 ^a	帕洛沙姆 188 mg/ml		聚山梨酯 80 mg/ml	
			4	8	1	2
起始	0	1.05	1.05	1.06	1.07	1.10
2-8°C	1	0.98	0.99	0.99	1.01	1.02
	2	1.02	1.03	1.04	1.05	1.07
	3	1.06	1.07	1.08	1.08	1.09
	6	1.23	1.27	1.28	1.25	1.32
	9	1.30	1.35	1.36	1.34	1.36
25°C/60%RH	0	1.05	1.05	1.06	1.03	1.04
	1	1.92	1.94	1.92	1.97	2.02
	2	2.69	2.71	2.68	2.75	2.80

保存条件	时间/ 月	% 高分子量种类				
		对照 ^a	帕洛沙姆 188 mg/ml		聚山梨酯 80 mg/ml	
			4	8	1	2
	3	3.74	3.92	3.67	3.84	3.84
	5	5.12	5.16	5.03	5.05	5.03

^a 蛋白质：蔗糖 (1 : 1), 125mg/ml, pH 7.8

[0248] 表面活性剂作用的研究结果表明表面活性剂对 belatacept 药品溶液的稳定性不具有显著负面作用。在被评价的帕洛沙姆 188 水平中, 8mg/ml 的浓度足以防止制剂中硅氧烷相关颗粒的形成。

摩尔渗透压浓度

[0249] 使用蒸汽压方法测定不同缓冲液中不同蛋白质浓度下和来自制剂过程各独立步骤中的 abatacept 摩尔渗透压浓度。结果汇总于表 29。 表 29 不同缓冲液和浓度中 abatacept SC 溶液的摩尔渗透压浓度测定

Abatacept/ 缓冲液 / 赋形剂	蛋白质浓度 (mg/ml)	磷酸钠	氯化钠	摩尔渗透压浓度 (mOsm/kg)
Abatacept 药物	50	25mM	50mM	151
Abatacept, 透析过滤步骤	50	10mM	—	32
Abatacept 透析过滤 / 浓缩步骤	155	10mM	—	49
10mM pH 7.8 磷酸盐 缓冲液	—	10	—	35
Abatacept 水溶液	100	10mM	—	51
Abatacept : 蔗糖 (1 : 1)	100	10mM	—	567
Abatacept : 蔗糖 (1 : 1.75)	100	10mM	—	766
Abatacept : 蔗糖 (1 : 2)	100	10mM	—	913
Abatacept : 蔗糖 (1 : 1.36)	125	10mM	—	782

搅拌 / 振摇的作用

[0250] 测定搅拌对 100mg/ml 和 125mg/ml abatacept SC 药品溶液稳定性的作用。将 5cc 的试管中含有约 1ml 的溶液等分试样在 2-8°C 以腕臂式振荡器的第 3 级速度振摇。将振荡

器放置于冷室中使其温度保持在 2-8℃。以适当时间间隔取样并检测 pH 和外观,振摇 30 天后测定相同时间样品的生物活性。

[0251] 以 100mg/ml 和 125mg/ml 浓度 2-8℃ 振摇 30 天的样品没有显示出 HMW 种类、SDS-PAGE 曲线、肽图谱、B7 结合测定、pH、外观和蛋白质浓度的变化。

建议保存条件

[0252] abatacept SC 药品,125mg/ 注射器 (125mg/ml) 的建议保存条件为 2-8℃,建议保存期限为至少 12 个月。

实施例 IX

[0253] 脱酰胺作用和聚集为两条可观察到的 CTLA4Ig 分子降解途径。本方案列出了用于评价 SC 药品制剂在 pH 范围 6.3-7.2,特别是 pH 6.3、6.6、6.9 和 7.2 的 pH 稳定性的实验室规模 pH 稳定性研究。本研究的目的是为了就脱酰胺化和高分子量种类的形成而言确定可使 CTLA4Ig SC 制剂达到最少 18 个月的保存期的最佳低 pH 制剂。本研究使用的 SC 药品制剂如表 30 所述。表 30 pH 6.9 的 SC 药品制剂组成

成份	用量 mg/1.0ml
abatacept	125
蔗糖	170
帕洛沙姆 188	8
一水合磷酸二氢钠	0.638
无水磷酸氢二钠	0.475
注射用水	QS 1.0mL

[0254] 在 6.3、6.6、6.9 和 7.2 配制 SC 药品。使用上述蔗糖和帕洛沙姆 188 配制药剂,用 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.9) 调节终批产品浓度。用 1N HCl 将 pH 分别滴定至 6.3 和 6.6。或者用 1N NaOH 将 pH 滴定至 6.9、7.2 和 7.65。将药品装入 1-mL 长 Physioliis™ 注射器 (装量 1.0ml) 中并于 2-8℃、15℃、25℃和 35℃,60%湿度的条件下置于稳定状态。将样品覆盖或放入棕色避光袋中避光保存。

[0255] 在第 0、2、4、6、12、18、24 个月和任选第 9 个月时取样保存于 2-8℃的药品。在第 1、2、4、6 个月和任选第 9 个月时取样保存于 15℃的药品。在第 1、2、4 个月和第 6 个月时取样保存于 25℃和 60%湿度的药品。在第 1、2 和 4 个月时取样保存于 35℃的药品。检测保存于 2-8℃的样品的外观 (仅起始和最后一个样品)、pH (仅起始、4 个月和最后一个样品)、A280 (仅起始、4 个月和最后一个样品) 分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)、Biacore B7 结合 (仅起始、4 个月和最后一个样品或根据需要) 和等电聚焦 (IEF) (仅起始和最后一个样品)。检测保存于 15℃和 25℃、60%湿度下的样品的 A280 (仅起始、4 个月和最后一个样品)、分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)。检测保存于 35℃的样品的分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)。

[0256] 可使用非常规检测法进一步表征在起始时间点、4 个月、12 个月和研究结束时的稳定性样品。如果观察到某种趋势或预料之外的结果可使用一些这样的方法检测特异性样品。非常规方法包括:应用多角度光散射 (SEC-MALS) 的分子排阻色谱法、动力结合 (SPR)、质谱测定法、CD、AUC、差示扫描量热法 (DSC)、FFF、FTIR、分子排阻 HPLC (变性) 和 SDS-PAGE (银染)。

实施例 X

[0257] 在 2B 阶段、多中心、随机化、双盲、安慰剂对照研究中加入 PK 亚组研究以评价 abatacept 两种不同剂量的安全性和临床药效,其被静脉给予患有活动性风湿性关节炎并接受甲氨喋呤的患者。在这一平行设计研究中,受试者同时接受 MTX 和两种不同剂量的 (2 和 10mg/kg) abatacept 或安慰剂。如 2005 年 12 月 20 日申请的同时待审的美国专利申请序列号 60/752267 所述生产 Abatacept,该专利描述了用动物或哺乳动物细胞培养生产本发明蛋白质的方法,特别是重组糖蛋白产品,产品为如本文所述的低压冻干形式,每支管形瓶包含 200mg abatacept。在第 1、15 和 30 天静脉给予受试者 Abatacept,之后每 30 天给药一次并持续一年。从招募来参加位点专一性 PK 亚组研究的受试者的第 60 至 90 天给药间隔获得的血药浓度对时间的数据中得到多剂量 PK。对于 PK 亚组研究中的受试者,在第 60 天给药前收集血液样本,PK 曲线的血液样本收集从第 60 天开始,在开始输注 30 分钟 (对应于 abatacept 输注结束)、4 小时后,每周一次直至第 90 天。共招募 90 名患者参加 PK 亚组研究。但是从 29 名受试者 (15 名受试者的剂量为 2mg/kg, 14 名受试者的剂量为 10mg/kg) 中得到 60 至 90 天给药间隔的完整 PK 曲线。

[0258] PK 参数汇总于表 31。该研究结果显示了 C_{max} 和 AUC(TAU), 其中 TAU = 30 天,均以剂量比例方式增加。对于以 1 : 5 的比例增加的名义剂量, C_{max} 几何平均值以 1 : 5.2 的比例增加,而 AUC(TAU) 几何平均值以 1 : 5.0 的比例增加。此外, T-HALF、CLT 和 V_{ss} 值表现出与剂量无关。在这些 RA 受试者中,平均 T-HALF、CLT 和 V_{ss} 值分别约为 13 天、~ 0.2mL/h/kg 和 ~ 0.07L/kg。小 V_{ss} 值表明 abatacept 主要集中在胞外液中。基于第一次输注后的第 2 和 4 周给药然后每月给药一次的给药方案,第 3 个月给药时达到 abatacept 的稳态。而且,由于该给药方案,在治疗起始的 2 个月中血清浓度高于稳态时的谷浓度。将 60、90 和 180 天的谷 (C_{min}) 值进行比较发现每月给药并不会出现 abatacept 蓄积。所有接受每月静脉给药 2 和 10mg/kg abatacept 的受试者的平均 C_{min} 稳态值分别为 4.4-6.7mcg/mL 和 22.0-28.7mcg/mL。

表 31
风湿性关节炎受试者中多剂量 PK 研究汇总

研究方案 (国家)	产 品 ID (批 批 / 号)	研究目的	研究设计	受 试 者 (男 性 / 女 性)	年 龄 (平 均 值, 范 围)	治 疗 剂 量 (mg/kg)	Abatacept 药代动力学参数				
							平 均 值		平 均 值 (SD)		
							Cmax (µg/mL)	AUC(TAU) (µg.h/mL)	T- HALF (天)	CLF (mL/h/kg)	Vss(L/kg)
IM1011 (USA) PK 亚组 研究 阶段 II	C00157 C00196 C98283	评价静脉 给药剂量 的 abatacept 的有效性、 安全性、 多剂量和 免疫原性 潜力	随机、双 盲、安慰 剂对照、 多剂量研 究。30 分 钟 IV 输注	29 (18/11)	54 (34- 83)	2.0 (N=15)	54.9 (29)	9573.6 (30)	13.5 (5.9)	0.23 (0.13)	0.07 (0.04)
						10.0 (N=14)	284.2 (23)	47624.2 (31)	13.1 (5.3)	0.22 (0.09)	0.07 (0.03)

[0259] 在给健康成年受试者单次静脉输注 10mg/kg 后和 RA 患者多次静脉输注 10mg/kg 后研究 abatacept 的药代动力学（见表 32）。表 32 健康受试者和 RA 患者 10mg/kg 静脉

输注后的药代动力学参数（均值、范围）

PK 参数	健康受试者 (10mg/kg 单次给药 后) n = 13	RA 患者 (10mg/kg 多次给药 后) n = 14
峰浓度 (C _{max}) [mcg/mL]	292 (175-427)	295 (171-398)
终末半衰期 (t _{1/2}) [天]	16.7 (12-23)	13.1 (8-25)
全身清除率 (CL) [mL/h/kg]	0.23 (0.16-0.30)	0.22 (0.13-0.47)
分布体积 (V _{ss}) [L/kg]	0.09 (0.06-0.13)	0.07 (0.02-0.13)

[0260] ^a 在第 1、15、30 天和之后每月一次的多次静脉输注给药

[0261] RA 患者和健康受试者的 abatacept 药代动力学具有可比性。在 RA 患者中,多次静脉输注后,abatacept 药代动力学显示出在剂量范围 2mg/kg-10mg/kg 内 C_{max} 和 AUC 成比例增加。在 10mg/kg,血清浓度在第 60 天表现出达到稳态,平均(范围)谷浓度为 24(1-66) mcg/mL。以每月间隔 10mg/kg 继续重复治疗时并没有在 RA 患者中观察到 abatacept 的全身蓄积。

[0262] RA 患者的群体药代动力学研究表明随着体重的增加 abatacept 清除率有增加的趋势。年龄和性别(经体重的修正)不影响清除率。联合使用甲氨喋呤(MTX)、非甾体抗炎药(NSAIDs)、皮质激素和 TNF 阻断剂不影响 abatacept 清除率。

abatacept 的血清分析

[0263] 用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 abatacept 的血清样品,共分析 25 批。所有检测结果均达到样品分析前建立的可接受标准,表明 ELISA 方法可以精确准确地定量 abatacept 研究样品。Abatacept 在血清中标准曲线参数和平均 QC 数据汇总于表 33。对 abatacept 的分析 QC 批次之间和批次内的差异分别为 4.5%和 3.5% CV。所观察的分析 QC 样品的平均浓度与名义值的偏差小于 $\pm 8.9\%$ (表 33)。表 33 分析人血清 abatacept 的质控数据汇总

名义浓度	低 (3.000ng/mL)	中 (12.500 ng/mL)	高 (24.000 ng/mL)
观察到的平均 浓度	2.866	13.608	24.526
% 偏差	-4.5	8.9	2.2
批次间精密度 (% CV)	4.5	2.8	3.0
批次内精密度 (% CV)	2.4	3.5	2.9
总差异 (% CV)	5.1	4.5	4.2
N	75	75	75
批次	25	25	25

实施例 XI

[0264] 本研究目的为检测单次 SC 给药健康受试者 50-150mg belatacept 后的 PK;检测注射体积和被注射溶液的浓度对皮下给药 belatacept 的 PK 的作用;检测 belatacept 单次 SC 给药的安全性和耐受性(包括注射位点评价),评价皮下注射 belatacept 的免疫原性。

[0265] 这是在健康受试者中进行的双盲、随机化、安慰剂对照、平行组、单次给药研究。共有 42 名受试者被随机分配至 6 个治疗组之一。每一组有 7 名受试者,在第一天将受试者以 5:2 随机分配接受 belatacept 或安慰剂单次 SC 注射。要求受试者的体重 ≤ 100 kg。6 个治疗小组的描述见表 34。表 34 治疗小组

治疗小组	Belatacept 或安 慰剂剂量	注射体积	被注射溶液的 浓度
1	50mg	0.4mL	125mg/mL
2	75mg	0.6mL	125mg/mL
3	100mg	0.8mL	125mg/mL
4	150mg	1.2mL	125mg/mL
5	50mg	1.0mL	50mg/mL
6	75mg	1.0mL	75mg/mL

[0266] 对受试者进行筛选评价以确定 28 天之内在第 1 天给药的资格。在给药前一天(-1

天) 允许受试者进入临床实验室检测基线值, 包括 MLR。受试者将一直在临床实验室内直至第 5 天治疗后检测结束, 此后每次研究就诊时需回到临床实验室直至研究解散。

[0267] 第 1 天, 受试者被随机分配接受 belatacept 或安慰剂的单次 SC 给药并进行详细的 PK 和免疫原性取样。所有受试者将于大腿前部接受 SC 注射。在给药被研究药物之后, 研究人员将检测注射部位是否存在局部刺激和发炎的征兆。

[0268] 在研究中的选择时间点进行体检、生命体征检测和临床试验评价。收集被研究药物给药后 56 天的血液样本用于 PK 分析和免疫原性检测。在整个研究过程中监控受试者的 AEs。研究中约从每个受试者抽取 265mL 血液。

[0269] 对于所有的剂量组, 给药和随访同时进行。所有受试者均不接受多于单次剂量。未完成研究的受试者(除了由于 AEs 中断研究的受试者)将被取代。

[0270] 本研究为单次剂量研究。每一位受试者将经历筛选阶段, 最多在被研究药物给药前持续 28 天。每一位受试者将参与研究中直至最后一次就诊, 即被研究药物给药后的 56 天 (± 2 天)。参与研究的最后一位受试者的最后一次就诊被认为是本研究的结束。

[0271] 如本文所述, 根据 2006 年 10 月 5 日申请的同时待审美国专利申请序列号 60/849543(描述了通过动物或哺乳动物细胞培养生产本发明蛋白, 特别是重组糖蛋白产品) 所述生产的 Belatacept 100mg/管形瓶 (125mg/mL) 为随时可用的装在玻璃管形瓶中的液体产品, 可使用适当大小的用于 SC 给药的常规注射器和针头抽取与给药。每一支管形瓶中都包含足够过量的 belatacept 以补偿抽取时的损失, 这样可以抽取含有 100mg 的 0.8mL 溶液用于 SC 给药。

[0272] Belatacept 注射剂 100mg/管形瓶 (125mg/mL) 不可用于 IV 输注。

[0273] 经医疗史、体检、12 导联心电图和临床实验室评价的健康病人可参与本研究。本研究包括男性和女性。受试者必须至少 18 岁并且随机化时的体重 ≤ 100 。女性受试者必须不在哺乳期、孕期并且在给药之前至少一个月、研究过程中和研究结束后 4 周使用可接受的避孕方法。育龄妇女在研究药物给药前 24 小时内进行的血清妊娠检测必须为阴性。将告知受试者对妊娠的潜在危险。男性受试者在研究过程中和研究结束后 4 周必须使用可接受的避孕方法以最大程度降低他们伴侣的妊娠风险。详细的入组和排除标准见第 5 章。

[0274] 入组前 4 周内使用的药物必须记录于 CRF。除口服避孕药以外, 研究中不允许同时用药(处方药、非处方药或草药), 除非由研究人员开具处方的用于治疗特殊临床事件的药物。任何联合疗法必须记录于 CRF。

[0275] 由血清浓度比时间数据得到 SC 注射后的 belatacept PK。需检测的单次剂量 PK 参数包括: C_{max} 观察到的最大血清浓度 T_{max} 观察到最大血清浓度的时间 $AUC(0-T)$ 从时间 0 至最后一个可计量浓度的时间之间的血清浓度-时间曲线下面积 $AUC(INF)$ 从时间 0 至无穷大时间之间的血清浓度-时间曲线下面积 半衰期 血清半衰期 CLT/F 表观总体清除率 VSS/F 稳态时的表观分布容积

[0276] 由非房室方法通过已验证的 PK 分析程序 (eToolboxKinetica 程序, Innaphase Corp, Philadelphia, PA) 得到单个受试者的 PK 参数。也报告剂量归一化 AUC。

[0277] 收集一段时间内的血清样品并用两种 ELISA 分析法检测是否存在 belatacept 的抗体滴度。一种分析法检测对整个分子的反应性, 另一种分析法仅针对 LEA29Y-T 部分。

[0278] 所有接受被研究药物的受试者均包含于安全性和 PD 数据集。任一组中接受安慰

剂的受试者将被集中于一个单次安慰剂治疗组中用于 PD 评价和除注射位点评价以外的安全性评价。所有来自接受 belatacept 的受试者的可用数据将包含于 PK 数据集并将包含在汇总统计和统计学分析中。

[0279] 第 1 天为基线。按照治疗（注射体积和剂量）列表显示性别和种族的频率分布。按照治疗方法列表显示年龄、体重和身高的汇总统计。

[0280] 按照优选术语、全身器官分类和治疗列出并列表显示所有记录的 AEs。按照治疗列表并汇总生命体征和临床试验检测结果。将列出任何显著的身体检查结果和临床试验结果。按照治疗和严重程度列表显示注射位点评价（红斑、发热、肿胀、疼痛和瘙痒）。集合剂量组的安慰剂受试者并且进行单独分析，同时用于评价注射位点。

[0281] 按照治疗列表显示 PK 参数的汇总统计。显示 C_{max}、AUC (0-T) 和 AUC (INF) 的几何均值和变异系数。显示 T_{max} 的中值、最小值和最大值。提供其它 PK 参数的平均值和标准偏差。为了评价 SC 给药后对剂量的依赖型，提供 C_{max} 和 AUC (INF) 对剂量的散布图。构建 AUC (INF) 和 C_{max} 对注射体积的散布图以评价其对 belatacept PK 的作用。适用时也提供 C_{max} 和 AUC (INF) 对固定体积剂量以及 C_{max} 和 AUC (INF) 对剂量内体积的散布图。

[0282] 按照治疗、抗 -belatacept 和抗 -LEA29Y-T 抗体值的研究日期、与基线相比的变化（第 1 天 -0 小时）列表显示汇总统计。为了研究免疫原性和暴露之间可能的联系提供抗 -belatacept 和抗 -LEA29Y-T 抗体对 belatacept 浓度的变化曲线。

[0283] PK 和免疫原性采血时间表列于表 35。 表 35 药代动力学和免疫原性采血时间表

研究天数	时间（相对于给药） 小时 :分钟	PK	免疫原性
1	00:00 (给药前) 01:00 02:00 06:00 12:00	X X X X X	X ^a
2	24:00 36:00	X X	
3	48:00 60:00	X X	
4	72:00 84:00	X X	
5	96:00	X	
6	120:00	X	
7	144:00	X	
8	168:00	X	
14		X	X
21		X	
28		X	X
35		X	X
42		X	X
56		X	X

[0284] ^a 第一天的免疫原性（抗 -belatacept 抗体）样品必须在给药前采集。第 28、35、42 和 56 天的样品可在 ±2 天内采集。

[0285] 上表 35 列出了用于 PK 检测的取样时间表。通过直接静脉穿刺或从盐水闸 (saline lock) 中将血液样品（每份样品约 3mL）收集于预标记的、红色和灰色盖子的 (SST) Vacutainer. ®管中。如果使用盐水闸系统采血，应从留置导管中抽取约 0.5mL 的血液并在获得每一份 PK 样品前丢弃。当获得 PK 样品后，允许血液于室温下在 Vacutainer®管中凝结 15-30 分钟。凝结后将样品在冷冻离心机 (4℃) 中 1500xg 离心 15 分钟。当离心结束时，用移液管从每一时间点的 PK 样品至少移除 0.5mL 血清并转移至预先标记的、具有螺旋瓶盖的、聚丙烯 PK 保存和转运管中。每一取样时间点的血清等分试样必须使用新的移液管。含有 PK 血清样品的聚丙烯管可于 -20℃或更低温度冷冻保存最多一个月，然后 -70℃

保存。从收集样品至冷冻血清允许的时间为 12 小时。可使用一种敏感的、已验证的酶免疫测定法 (EIA) 检测血清中 belatacept 的浓度。

[0286] 表 35 列出了检测免疫原性的取样时间表。在就诊的第 1、14、28、35、42 和 56 天采集血清样品。第一天的免疫原性 (抗-belatacept) 样品应在给予被研究药物之前采集。检测样品是否存在抗-belatacept 和抗-LEA29Y-T 抗体。对于每一份样品,通过直接静脉穿刺或从盐水闸中将血液样品 (每份样品约 3mL) 收集于预标记的、红色和灰色盖子的 (SST) Vacutainer.®管中。如果使用盐水闸系统采血,应从留置导管中抽取约 0.5mL 的血液并在获得 每一份免疫原性样品前丢弃。当获得样品后,允许血液于室温下在 Vacutainer®管中凝结 15-30 分钟。凝结后将样品在冷冻离心机 (4℃) 中 1500xg 离心 15 分钟。当离心结束时,用移液管从每一时间点的 PK 样品至少移出 1mL 血清并转移至预先标记的、具有螺旋瓶盖的、聚丙烯 PK 保存和转运管中。含有血清样品的聚丙烯管可于 -20℃或更低温度冷冻保存。可使用两种敏感的、已验证的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 测定血清中 belatacept 的抗体滴度。一种检测法检测对整个分子的抗体滴度,另一种检测法仅针对 LEA29Y-T 部分。

实施例 XII

[0287] 脱酰胺作用、片段化和聚集为可观察到的 LEA29YIg 分子降解途径。本方案另外列出了用于评价 pH 范围 6.3-7.5 的 SC 药品制剂的实验室规模 pH 稳定性研究。本研究的目的是为了确定可使 belatacept SC 制剂达到最少 18 个月的保存期的最佳 pH 制剂。

[0288] 为了这项研究,在 pH 6.3、6.6、6.9、7.2 和 7.5 配制 belatacept SC 药品。首先将 ~25mg/mL 的 belatacept 药物浓缩至 ~100mg/mL。然后渗滤进入 pH 6.9 的 10mM 磷酸盐缓冲液,之后进行第二次浓缩得到 >160mg/mL 的药品中间体 (DPI)。将 DPI 与蔗糖和帕洛沙姆 188 一起配制,用 10mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.9) 调节终批产品浓度。将已配制的总体溶液分为 5 个亚批次,如研究设计中所示。用 1N 盐酸分别将亚批次的 pH 滴定至 6.3 和 6.6。用 1N NaOH 将另外 2 个亚批次的 pH 滴定至 6.9、7.2 和 7.5。将批产品装入 1-mL 长 Physiols™ 中。将样品覆盖或放入棕色避光袋中避光保存。用于本研究的 SC 药品制剂如表 36 所示。表 36 pH 6.9SC 药品制剂的组成

成份	每 1.0mL 用量 (mg)
Belatacept	125
蔗糖	170
帕洛沙姆 188	8
一水合磷酸二氢钠	0.638
无水磷酸氢二钠	0.475
注射用水	适量至 1.0mL

[0289] 在第 0、2、4、6、12、18、24 个月和任选第 9 个月时取样保存于 2-8℃的药品。在第 1、2、4、6 个月和任选第 9 个月时取样保存于 15℃的药品。在第 1、2、4 个月和第 6 个月时取样保存于 25℃和 60%湿度的药品。在第 1、2、4 个月时取样保存于 35℃的药品。检测保存于 2-8℃的药品的外观 (仅起始和最后一个样品)、pH (仅起始、4 个月和最后一个样品)、A280 (仅起始、4 个月和最后一个样品)、分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)、Biacore B7 结合 (仅起始、4 个月和最后一个样品或根据需要) 和等电聚焦 (IEF) (仅起始和最后一个样品)。检测保存于 15℃和 25℃、60%湿度下的样品的 A280 (仅起始、4 个月和最后一个样品)、分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)。检测保存

于 35℃ 的样品的分子排阻 HPLC、SDS-PAGE、胰蛋白酶消化肽图谱 (TPM)。

[0290] 可使用非常规检测法进一步表征在起始时间点、4 个月、12 个月和研究结束时的稳定性样品。如果观察到某种趋势或预料之外的结果也可使用一些这样的方法检测特异性样品。非常规方法包括：应用多角度光散射 (SEC-MALS) 的分子排阻色谱法、动力结合 (SPR)、质谱测定法、CD、AUC、差示扫描量热法 (DSC)、FFF、FTIR、分子排阻 HPLC (变性) 和 SDS-PAGE (银染)。

[0001]

CPCH0862216P

序 列 表

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
DALI, MANISHA
DAHLHEIM, CHARLES E.
BORSADIA, SUNITA
NARINGREKAR, VIJAY H.
GANDHI, RAJESH B.
NERURKAR, MANOJ

<120> STABLE PROTEIN FORMULATIONS

<130> 10739 WO PCT

<140> PCT/US06/62297

<141> 2006-12-19

<150> 60/752,150

<151> 2005-12-20

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成引物-CTLA4Ig

<400> 1

atgggtgtac tgctcacaca gaggacgtg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca	60
agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggctactgc cagcagccga	120
ggcctcgcga gcttltgtlg tgagtalgca tctccaggca aagccacitga ggtccgggtg	180
acagltgctc ggccaggctga cagccagggt actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg	240
gggaatgagt tgaccttctt agatgattec atctgcacgg gcacctccag tggaatcaa	300
gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagtg	360
gagctcatgt acccaccgcc alactacctg ggcalaggca acggaacca gaittaigia	420
attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac	480
acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagttct cctcttcccc	540
ccaaaacca aggacacctt catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtgtg	600
gacgtlgacc acgaagacct tgaggtcaag ticaaciggt acgtggacgg cgtggaggig	660
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc	720
gtcttcaccg tcttcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc	780
aacaagcccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	840
gaaccacagg tglacacctt gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc	900
ctgacctgcc tggicaaagg ctictalccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat	960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctctctc	1020
tctctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca	1080

[0002]

tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 2
 <211> 383
 <212> PR7
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽-CTLA41g

<400> 2

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 210 215 220

[0003]

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 245 250 255
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 260 265 270
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 275 280 285
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 290 295 300
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 325 330 335
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 340 345 350
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 355 360 365
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380
 <210> 3
 <211> 1152
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成引物-L104EA29Y1g
 <400> 3
 atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcaagtctgg tccllgcact cctgttticca 60
 agcatggcga gcalggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtaactggc cagcagccga 120
 ggcatcgcta gctttgtgtg tgaagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180
 acagtgcctc ggcaggctga cagccagggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240
 gggaalgagl tgaccttccct agatgatgcc atctgcacgg gcacctccag tggaaalcaa 300
 gtgaacctca ctalccaagg acagagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaagglg 360
 gagtcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataaggca acggaacca gatttatgta 420
 attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480
 acatccccac cgiccccgag acctgaactc ctggggggat cgtcagtcct cctcttcccc 540
 ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg 600
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

[0004]

```

cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780
aacaagagccc tccagagccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagagccga 840
gaaccacagg tgtacaccct gcccctatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900
ctgacctgcc tgggtcaaagg ctcttatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctc tggactccga cggtctcttc 1020
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080
tgctccgtga tgcatgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140
ccgggtaaat ga 1152

```

<210> 4
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽-L104EA29YIg

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val

[0005]

	165	170	175
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	180	185	190
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	195	200	205
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	210	215	220
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	225	230	235
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	245	250	255
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	260	265	270
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	275	280	285
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	290	295	300
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	305	310	315
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	325	330	335
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	340	345	350
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	355	360	365
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	370	375	380

图 1A

图 1B

ATGGGTGTA	-19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--	-7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA	+42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--	+14
+1	
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAATATACTGAGGTCCGGGTG	+102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--	+34
ACAGTGCCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG	+162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--	+54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAA	+222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--	+74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG	+282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--	+94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA	+342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--	+114
ATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACCTCAC	+402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--	+134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCGTCAGTCTCCTCTTCCCC	+462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--	+154
CCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG	+522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--	+174
GACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG	+582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--	+194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC	+642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--	+214
GTCTCACCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC	+702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--	+234
AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGCAGCCCCGA	+762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--	+254
GAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC	+822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--	+274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	+882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--	+294
GGGAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	+942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--	+314
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCGGGAACGTCTTCTCA	+1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--	+334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT	+1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--	+354
CCGGGTAAATGA	
P--G--K--*	

图 2