



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114828826 A

(43) 申请公布日 2022.07.29

(21) 申请号 202080075626.2

(22) 申请日 2020.10.29

(30) 优先权数据

62/927,716 2019.10.30 US

62/927,720 2019.10.30 US

62/933,692 2019.11.11 US

62/936,269 2019.11.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/057868 2020.10.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/087050 EN 2021.05.06

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 F·比克尔 L·博阿多

D·切利乌斯 F·格里奥德

C·伊贝尔 F·克勒纳 J·西格

R·保罗 M·安科 A·耶伦科

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

权利要求书3页 说明书35页

序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

含有抗体配制品的立赞利珠单抗

(57) 摘要

本发明涉及针对人P-选择蛋白的抗体特别是SEG101的,或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体的新颖药物配制品,及其制备方法和该配制品的用途。

1. 一种药物组合物,所述药物组合物包含立赞利珠单抗以及立赞利珠单抗变体(异立赞利珠单抗),所述立赞利珠单抗具有分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的轻链和重链氨基酸序列,在所述立赞利珠单抗变体中SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸变为异天冬氨酸。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,所述药物组合物还包含立赞利珠单抗的在SEQ ID NO:10的位置32处的琥珀酰亚胺。

3. 如权利要求1或2所述的药物组合物,其中所述异立赞利珠单抗由同-异立赞利珠单抗和杂-异立赞利珠单抗组成。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含所述药物组合物中总电荷变体的至少20%立赞利珠单抗。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含所述药物组合物中总电荷变体的至多50%立赞利珠单抗。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含所述药物组合物中总电荷变体的约20%至约50%立赞利珠单抗。

7. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含缓冲液系统,其中所述组合物的pH为约5.5至约7.5。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述pH为约5.5至约7、优选约5.5至约6.5、优选约5.7至约6.3。

9. 如权利要求7或8所述的药物组合物,其中所述pH为约5.9至约6.1。

10. 如权利要求7-9中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲液系统是柠檬酸盐缓冲液。

11. 如权利要求7-9中任一项所述的药物组合物,其中所述缓冲液系统是磷酸盐缓冲液。

12. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含稳定剂。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其中所述稳定剂是蔗糖。

14. 如权利要求13所述的药物组合物,其中蔗糖的浓度为50mM至350mM,优选为100mM至300mM。

15. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含等渗剂。

16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述等渗剂是氯化钠。

17. 如权利要求16所述的药物组合物,其中氯化钠的浓度为50mM至300mM。

18. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含表面活性剂。

19. 如权利要求18所述的药物组合物,其中所述表面活性剂是非离子表面活性剂。

20. 如权利要求18或19所述的药物组合物,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯,优选聚山梨醇酯80。

21. 如权利要求18至20中任一项所述的药物组合物,其中所述表面活性剂,优选聚山梨醇酯的浓度为0.01%w/v (0.1mg/mL) 至0.1%w/v (1mg/mL)。

22. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中抗体的浓度为5mg/ml至50mg/ml。

23. 一种药物组合物,所述药物组合物包含浓度为约5mg/ml至约50mg/ml的抗体、和缓

冲液系统,其中所述组合物的pH为约5.5至约7.5。

24. 如权利要求23所述的药物组合物,其中所述pH为约5.7至约6.3。

25. 如权利要求23或24所述的药物组合物,其中所述缓冲液系统是柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)和/或磷酸盐(例如磷酸钾)。

26. 如权利要求23-25中任一项的药物组合物,所述药物组合物还包含稳定剂。

27. 如权利要求26所述的药物组合物,其中所述稳定剂是蔗糖。

28. 如权利要求26或27所述的药物组合物,其中所述稳定剂以约50mM至约300mM的浓度存在。

29. 如权利要求23-28中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含非离子表面活性剂。

30. 如权利要求29所述的药物组合物,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

31. 如权利要求29或30所述的药物组合物,其中所述表面活性剂以约0.01%w/v(0.1mg/ml)至0.1%w/v(1mg/ml)的浓度存在。

32. 如权利要求23-31中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物还包含等渗剂。

33. 如权利要求32所述的药物组合物,其中所述等渗剂是NaCl。

34. 如权利要求32或33所述的药物组合物,其中所述等渗剂以约50mM至300mM的浓度存在。

35. 一种药物组合物,所述药物组合物包含浓度为约5mg/ml至约50mg/ml的抗体(立赞利珠单抗及其任何变体)、浓度为约50mM至约350mM的蔗糖、以及缓冲液系统,其中所述组合物的pH为约5.5至约7.5,并且其中所述缓冲液系统是柠檬酸盐缓冲液和/或磷酸盐缓冲液。

36. 如权利要求35所述的药物组合物,其中所述药物组合物的pH为约5.7至约6.3,例如约6.0。

37. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物呈冻干形式。

38. 一种通过将水性配制品冻干可获得的冻干配制品,其中所述冻干配制品包含:

a) 抗体(立赞利珠单抗及其任何变体);

b) 冻干保护剂;和

c) 缓冲液系统。

39. 如权利要求38所述的冻干配制品,所述冻干配制品还包含表面活性剂。

40. 如权利要求39所述的冻干配制品,其中所述表面活性剂是聚山梨醇酯80。

41. 如权利要求38-40中任一项所述的冻干配制品,其中抗体以约10mg/mL至100mg/mL的浓度存在于所述水性配制品中。

42. 如权利要求38-41中任一项所述的冻干配制品,其中所述缓冲液系统是柠檬酸盐,例如柠檬酸钠。

43. 如权利要求38-42中任一项所述的冻干配制品,所述冻干配制品还包含蔗糖和/或甘露醇作为冻干保护剂。

44. 如权利要求38-43中任一项所述的冻干配制品,其中所述水性配制品包含浓度为约10mg/mL至100mg/mL的蔗糖。

45. 如权利要求43-44中任一项所述的冻干配制品,其中蔗糖与抗体的摩尔比为约200至1500。

46. 如权利要求38-45中任一项所述的冻干配制品,所述冻干配制品包含

a) 约25w/w%-40w/w%,优选约28w/w%-32w/w%的抗体;和

b) 约55w/w%-75w/w%的蔗糖,优选约65w/w%-71w/w%的蔗糖,这是基于所述冻干配制品的总重量。

47. 一种液体药物组合物,所述液体药物组合物通过重构如权利要求37至46中任一项所述的冻干配制品而获得。

48. 如前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中通过使用所述药物组合物测定的IC50在约4.6-6.2 μ g/ml的范围内。

49. 如权利要求48所述的药物组合物,其中所述IC50是在体外进行测定。

50. 一种治疗有需要的受试者的镰状细胞病,尤其是预防血管闭塞危象(VOC)的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效剂量的包含在如权利要求1-47中任一项所述的药物组合物中的抗体(立赞利珠单抗及其任何变体),其中所述治疗有效剂量为5mg或7.5mg/千克受试者体重。

51. 如权利要求50所述的方法,其中前2个剂量隔开2周施用,然后每四周施用相同剂量。

52. 如权利要求50或51所述的方法,其中通过静脉内途径将所述药物组合物施用于受试者。

53. 如权利要求50至52中任一项所述的方法,其中所述治疗有效剂量为5mg/千克受试者体重,其中前2个剂量隔开2周施用,然后每四周施用相同剂量,并且其中满足以下PK参数中的一个或多个或所有:

a) 在施用所述药物组合物后 t_{max} 在0.4至10小时(h)的范围内,优选0.55h至6.25h,其中优选中位数为1.5至2.5h,优选1.92h;

b) 首个剂量后 C_{max} 在 $116 \pm 91.3 \mu\text{g/mL}$ 的范围内;或优选地在稳定状态下为 $50 \mu\text{g/mL}$ 至 $200 \mu\text{g/mL}$,优选为 $124 \mu\text{g/mL} \pm 31.6 \mu\text{g/mL}$;

c) 表观 $t_{1/2}$ 在100h至300h的范围内,优选在150h至210h的范围内,例如约183h(7.6天);

d) $AUC_{\tau,ss}$ 在 10000 至 $30000 \mu\text{g} \times \text{h/mL}$ 的范围内,优选在第15周时为 $20400 \mu\text{g} \times \text{h/mL}$,优选变异系数为23.5%;

e) 优选在具有SCD且体重为70kg的患者中,在稳定状态第15周的平均清除率在 10mL/h 至 30mL/h 的范围内,优选 15mL/h 至 20mL/h ,例如约 17.2mL/h ;

f) 稳定状态下每4周,尤其是从第7周到第27周获得的PK谷浓度范围从约 $3.78 \mu\text{g/mL}$ 至 $9.8 \mu\text{g/mL}$ 。

54. 如权利要求50至52中任一项所述的方法,其中血清中的立赞利珠单抗及其任何变体实现对P-选择蛋白与PSGL-1的结合的至少70%、至少80%、至少90%、至少95%的抑制。

含有抗体配制品的立赞利珠单抗

技术领域

[0001] 本发明涉及针对人P-选择蛋白的抗体特别是SEG101的,或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体的新颖药物配制品,及其制备方法和该配制品的用途。

背景技术

[0002] P-选择蛋白促成许多炎性疾病和血栓形成疾病。因此,靶向P-选择蛋白的治疗剂,例如WO 2008/069999中披露的针对人P-选择蛋白的抗体,尤其是SEG101(又名立赞利珠单抗和Se1G1),可以用作治疗炎性疾病和血栓形成疾病的手段。

[0003] 在储存过程中,配制的抗体可能会因化学和物理不稳定而丧失生物学活性。抗体或甚至赋形剂的降解、电荷变体的形成和异构化反应是导致安全性问题以及随时间推移配制品效力和功效降低的常见因素。

[0004] 方便地,蛋白质治疗剂的液体药物配制品,例如抗体,应长期稳定并包含安全有效量的治疗剂。除了与物理和化学稳定性有关的挑战(例如聚集体的形成以及制造、储存和递送的困难)外,蛋白质治疗剂液体配制品的问题是降解和电荷变体的形成,这可能会对目标蛋白质的活性和功能性产生负面影响,而且引起安全问题。因此,需要开发如下配制品,这些配制品能够长时间维持蛋白质治疗剂稳定,最小化降解速率和其他分子种类如电荷变体和/或同种型的形成。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种抗P-选择蛋白抗体配制品,特别是对于立赞利珠单抗或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体,该配制品在储存和递送后是稳定的。进一步的目的是提供适合于静脉内(i.v.)施用的稳定的液体抗体配制品。

[0006] 在一个方面,本发明提供了包含立赞利珠单抗(该立赞利珠单抗具有分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的轻链和重链氨基酸序列)以及立赞利珠单抗变体(异立赞利珠单抗(iso-crizanlizumab))(其中SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸变为异天冬氨酸)的药物组合物。合适且优选地,药物组合物进一步包含缓冲液系统,导致药物组合物的pH值为5.5至7.5,优选为5.7至7.0,优选为5.7至6.3。

[0007] 药物组合物必须适合施用于人受试者。除了从所含活性成分中产生的作用外,该药物组合物还应适合与人组织接触使用,而不会产生过多的毒性、刺激、过敏反应、或其他问题或并发症,且具有合理的获益/风险比。

[0008] 在一个方面,本发明涉及新颖药物组合物,其包含针对人P-选择蛋白的抗体,优选地为立赞利珠单抗,或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体,其中pH值为5.5至7.5、5.7至7.0,优选5.7至6.3。

附图说明

[0009] 图1. 配制品pH值对CZE主峰的影响。

[0010] 图2. 配制品pH值对CZE碱性峰的影响。

[0011] 图3. 配制品pH值对CZE酸性峰的影响。

[0012] 图4. 通过SEC测量的筛选的配制品的纯度。

[0013] 图5. 立赞利珠单抗的pH依赖性异构化

[0014] 定义

[0015] 为了可以更容易地理解本披露内容, 首先定义某些术语。另外的定义在整个具体实施方式中陈述。

[0016] 如本文所用, 术语“一个/种 (a/an)”、“该 (the)”以及在本披露内容的上下文中使用的类似术语 (尤其在权利要求的上下文中) 应被解释为涵盖单数和复数二者, 本文中除非另外指示或与上下文明显相矛盾。因此, 术语“一个” (或“一种”)、“一个或多个”和“至少一个”在本文中可互换使用。

[0017] “和/或”意指列表的组分或特征中的每一者或两者或全部、尤其是其中两个或更多个是替代或累积方式的可能的变体。

[0018] 与数值X相关的术语“约”表示例如 $X \pm 10\%$ 、 $X \pm 5\%$ 、 $X \pm 3\%$, 包括该范围内的所有值。

[0019] 本文使用的短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断的范围内, 适合用于与人类和动物的组织接触而不产生过度毒性、刺激、过敏反应、或其他问题或并发症, 与合理的受益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0020] 如本文所用, 术语“患者”或“受试者”是指人。除非在指出时, 否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换地使用。

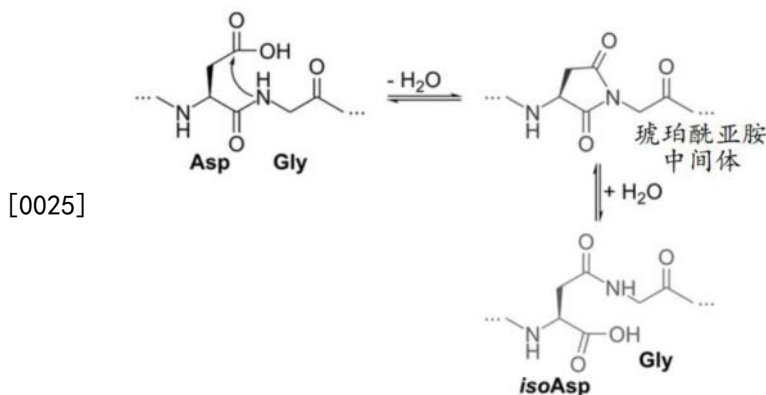
[0021] 如本文所用, 如果受试者将在生物学上、在医学上或在生活质量上从治疗中获益, 则这样的受试者是“需要”这种治疗的。

[0022] 术语“治疗”包括: (1) 预防或延迟可能患有或易患状态、障碍或病症但尚未经历或展现出状态、障碍或病症的临床或亚临床症状的动物、特别是哺乳动物并且尤其是人中正在发展的状态、障碍或病症的临床症状的出现; (2) 抑制状态、障碍或病症 (例如阻止、减缓或延迟疾病发展或其复发 (在维持治疗的情况下)、疾病的至少一种临床或亚临床症状的发展); 和/或 (3) 缓解病症 (即导致状态、障碍或病症或者其临床或亚临床症状中的至少一种的消退)。对要治疗的患者的益处是统计上显著的, 或者对于患者或医师至少是可察觉的。然而, 可以理解的是, 当将药物给予至患者以治疗疾病时, 结果可能并不总是有效的治疗。

具体实施方式

[0023] 蛋白质治疗剂的液体配制品应保持蛋白质治疗剂的完整生物学活性, 并保护蛋白质治疗剂的官能团在生产和保质期内不降解。蛋白质的降解途径可能涉及化学不稳定 (例如脱酰胺作用、氧化、修剪、异构化等) 或物理不稳定 (例如聚集体的形成)。抗体的不同降解产物可以通过本领域众所周知的方法例如毛细管等电聚焦 (cIEF)、离子交换色谱或毛细管区带电泳 (参见例如 doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.017 和 doi:10.4161/mabs.2.6.13333) 作为电荷变体进行检测。常见的电荷变体是唾液酸、脱酰胺、C末端赖氨酸、N末端谷氨酸、未加工的前导序列、天冬氨酸的异构化和琥珀酰亚胺的形成 (Yi Du等人, 2012.DOI:10.4161/mabs.21328)。

[0024] 立赞利珠单抗的微异质性与修饰或化学降解有关,这些修饰和化学降解导致大量经不同修饰的变体。立赞利珠单抗的主要变体是通过环酰亚胺中间体(琥珀酰亚胺)(其可以水解为摩尔比约1:3的天冬氨酸和异天冬氨酸)形成步骤经由轻链(CDR中)的位置32处的天冬氨酸异构化为异天冬氨酸而形成(产生在本文中称为“异立赞利珠单抗”变体)。然而,出人意料地发现,尽管该修饰存在于CDR中,但是异立赞利珠单抗显示出与立赞利珠单抗基本上相等的生物学活性。此外,相应的琥珀酰亚胺中间体在生理条件下能够被水解为天冬氨酸和异天冬氨酸(分别产生立赞利珠单抗和异立赞利珠单抗),这意味着将琥珀酰亚胺变体施用于患者后可以转化为具有生物活性的形式。根据该发现,本发明的药物组合物尽管包含立赞利珠单抗和大量不同的变体,但保留了立赞利珠单抗的生物活性并且长期稳定。另外,异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺的存在没有免疫原性问题。术语“免疫原性”是指在将本发明的药物组合物施用于人受试者(例如有需要的健康志愿者或患者)后能够结合立赞利珠单抗的宿主抗体的产生。在接受本发明药物组合物的所有受试者中,只有不到2%的人受试者产生抗立赞利珠单抗抗体。一方面,在生理条件下,合适地在药物施用后一天,在患者中,总立赞利珠单抗及其所有变体的少于5%、合适地少于2%、合适地少于1%、适当少于0.5%是立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺。此外,出人意料地发现异立赞利珠单抗具有低免疫原性,与立赞利珠单抗基本上相同。在上下文中所用的术语“基本上相同”是指在相同条件下进行测试时,异立赞利珠单抗的免疫原性比立赞利珠单抗的免疫原性高不超过5倍、不超过3倍、合适地不超过2倍、合适地不超过1.5倍。可替代地,在上下文中使用的术语“基本上相同”是指当在相同的条件下进行测试时,异立赞利珠单抗的免疫原性相比立赞利珠单抗的免疫原性不低于20%、合适地不低于40%、合适地不低于70%。



[0026] 因此,在一个方面,本发明提供了一种包含立赞利珠单抗(其分别具有SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的轻链和重链氨基酸序列)以及立赞利珠单抗变体(其中SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸变为异天冬氨酸)(异立赞利珠单抗)的药物组合物。

[0027] 术语“异立赞利珠单抗”由同-异立赞利珠单抗(homo-iso-crizanlizumab)和杂-异立赞利珠单抗(hetero-iso-crizanlizumab)两个种类组成。术语同-异立赞利珠单抗是其中两个轻链的位置32处的天冬氨酸残基被异天冬氨酸替代(即异构化为异天冬氨酸)的抗体。术语杂-异立赞利珠单抗是指其中仅一个轻链的位置32处的天冬氨酸残基被异天冬氨酸替代的抗体。

[0028] 就单个轻链而言,在位置32处具有天冬氨酸的轻链被称为 LC_D 。在位置32处具有异天冬氨酸的轻链被称为 LC_{isoD} 。在位置32处具有琥珀酰亚胺的轻链被称为 LC_{succ} 。

[0029] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含与立赞利珠单抗(其具有分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的轻链和重链氨基酸序列)具有最多3个、优选2个、更优选仅一个氨基酸差异的抗体及所述抗体的变体(其中SEQ ID NO:10的位置32处的天冬氨酸变为异天冬氨酸)。

[0030] 关于与立赞利珠单抗具有最多3个、优选2个、更优选仅一个氨基酸差异的抗体,该差异可以是错配,即用不同的残基替换残基。差异也可以是立赞利珠单抗序列中氨基酸残基的插入或缺失。差异可以在轻链和/或重链的序列中的任何地方,例如在抗体的不同结构域中(在CH₁、CH₂、CH₃、VH、CL、VL、铰链区、F_c和F_{ab}中)。优选地,所述差异不干扰抗体的基本特性,例如其结合其抗原即人P-选择蛋白的能力。优选地,差异不在对抗体功能至关重要的位置上,例如,CDR。特别地,在本发明的药物组合物的上下文中,差异不在SEQ ID NO:10的位置32处。

[0031] 在一个实施例中,药物组合物进一步包含变体(“立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺”),该变体是在SEQ ID NO:10的位置32处为琥珀酰亚胺(即天冬氨酸的琥珀酰亚胺同种型)。立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺通常是以下抗体,其在至少一个轻链的位置32处具有琥珀酰亚胺并且在另一个轻链的位置32处具有天冬氨酸或异天冬氨酸,或在非常酸性的条件下(例如pH为约5),两个天冬氨酸可以被琥珀酰亚胺替代。包含具有琥珀酰亚胺的一个轻链包和在位置32处具有天冬氨酸的另一个轻链的抗体被称为“立赞利珠单抗的D-琥珀酰亚胺”。包含具有琥珀酰亚胺的一个轻链包和在位置32处具有异天冬氨酸的另一个轻链的抗体被称为“立赞利珠单抗的异D-琥珀酰亚胺”。

[0032] 在一个实施例中,药物组合物在药物组合物中包含总电荷变体的至少20%、合适地至少24%、至少30%、合适地至少35%、合适地至少40%立赞利珠单抗(即主峰)。典型地且优选地,可以通过毛细管区带电泳(CZE)分析电荷变体。曲线下面积(AUC)通常用于确定每个峰相对于总AUC的百分比。为了清楚起见,即使在包含立赞利珠单抗的峰在所有峰中都不具有最大的AUC的极少数情况下,包含立赞利珠单抗的峰也将在本申请中被称为“主峰”。

[0033] 本申请中使用的术语“电荷变体”是指可以通过CZE鉴定的所有峰(包括立赞利珠单抗的峰)。本申请中使用的术语“碱性变体”是指与CZE图中的立赞利珠单抗相比,对应于较低时间值的峰。如本申请中使用的术语“酸性变体”是指与CZE图中的立赞利珠单抗的峰相比,对应于较高时间值的峰。例如,可以如实例4中所述执行CZE。

[0034] 有两个主要的酸性变体峰。具有较低时间值的峰包含杂-异立赞利珠单抗,具有较高时间值的峰包含同-异立赞利珠单抗。通过估计,总异立赞利珠单抗占酸性变体的约50%至约75%。

[0035] 存在几个碱性变体峰,其中具有时间值较低的峰包含立赞利珠单抗的D-琥珀酰亚胺,并且另一个具有较高时间值的峰包含立赞利珠单抗的异D-琥珀酰亚胺。通过估算,立赞利珠单抗的总琥珀酰亚胺占碱性变体的约25%至约50%。

[0036] 在一个实施例中,当进行CZE时,药物组合物显示主峰,其AUC是总AUC的至少20%、合适地至少24%、至少30%、合适地至少35%、合适地至少40%。

[0037] 在一个实施例中,药物组合物包含总电荷变体的至多70%、合适地至多60%、合适地至多50%、合适地至多45%立赞利珠单抗。

[0038] 在一个实施例中,当进行CZE时,药物组合物显示主峰,其AUC是总AUC的至多70%、

合适地至多60%，合适地至多50%、合适地至多45%。

[0039] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约20%至约50%、合适地约35%至约45%、合适地约37%至约42%立赞利珠单抗。

[0040] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约20%至约50%、合适地约35%至约45%、合适地约37%至约42%主峰。

[0041] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至少20%、至少30%异立赞利珠单抗。

[0042] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至少30%、合适地至少40%酸性变体。

[0043] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至多40%、合适地至多35%异立赞利珠单抗。

[0044] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至多56%、合适地至多45%酸性变体。

[0045] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约20%至约40%、合适地约25%至约35%异立赞利珠单抗。

[0046] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约30%至约50%、合适地约35%至约45%、合适地约37%至约42%酸性变体。

[0047] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至少5%、合适地至少10%立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺。

[0048] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的合适地至少10%碱性变体、至少15%碱性变体。

[0049] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至多15%、合适地至多20%立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺。

[0050] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至多20%、合适地至多25%、合适地至多35%碱性变体。

[0051] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约5%至约20%、合适地约10%至15%立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺。

[0052] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约10%至约35%、合适地约15%至25%碱性变体。

[0053] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的至少约55%、至少约60%立赞利珠单抗加上异立赞利珠单抗。

[0054] 在一个实施例中，药物组合物包含总电荷变体的约55%至约85%、约60%至约80%、约65%至约75%立赞利珠单抗加上异立赞利珠单抗。

[0055] 在一个实施例中，本发明提供了一种包含立赞利珠单抗(该立赞利珠单抗分别具有SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9的轻链和重链氨基酸序列)以及立赞利珠单抗变体(其中在SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸变为异天冬氨酸(异立赞利珠单抗))和在SEQ ID NO:10的位置32处为琥珀酰亚胺的变体(立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺)的药物组合物。

[0056] 使用毛细管区带电泳(CZE)，鉴定了电荷变体分布的pH依赖性动力学行为。在pH值低于6.3的孵育过程中，发生了琥珀酰亚胺积聚。

[0057] 孵育pH值越低,琥珀酰亚胺的积聚越多。pH值高于6.3时,会形成更多的异天冬氨酸,而琥珀酰亚胺的初始量降低到甚至比起始材料中观察到的水平更低(图5)。

[0058] 抗体互补决定区(CDR)中的化学修饰会影响与靶分子的结合活性。已经报道了琥珀酰亚胺作为CDR中的异构化变体对结合活性的影响(Yan B等人,2009,doi:10.1002/jps.21655;Cacia J等人,1996,doi:10.1021/bi951526c;Valliere-Douglass J等人,2008,doi:10.1016/j.chroma.2008.10.078;Ouellette D等人,2013,doi:10.4161/mabs.24458)。另外,如果在CDR中存在,还显示异天冬氨酸作为异构化变体会引起结合活性降低(Cacia J等人,1996,doi:10.1021/bi951526c;Harris RJ等人,2001,DOI:10.1016/s0378-4347(00)00548-x;Rehder DS等人,2008,doi:10.1021/bi7018223)。虽然发现与主峰(含有天冬氨酸,立赞利珠单抗)的效力相比,碱性级分(含有琥珀酰亚胺)的效力降低,但出人意料的是,发现含有异立赞利珠单抗的酸性变体保留了基本上相等于立赞利珠单抗的生物活性。

[0059] 因此,在一个方面,本发明提供了立赞利珠单抗的分离的变体,该立赞利珠单抗包含分别在SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9中的轻链和重链氨基酸序列,其中在SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸在抗体的一条轻链或两条轻链中被异天冬氨酸替换(异立赞利珠单抗)。在一个实施例中,通过形成琥珀酰亚胺中间体来进行替换。在一个方面,本发明提供了包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺的药物组合物,其中异立赞利珠单抗对人P-选择蛋白的结合亲和力基本上相等于立赞利珠单抗对人P-选择蛋白的结合亲和力。立赞利珠单抗或异立赞利珠单抗对P-选择蛋白的结合亲和力可以通过常规方法确定,例如通过ELISA(例如,如实例2.1)。在上下文中的术语“基本上相等”应理解为立赞利珠单抗和异立赞利珠单抗的结合亲和力相差不超过2倍、合适地不超过1.5倍、合适地不超过1.3倍、合适地不超过1.2倍。合适地,异立赞利珠单抗的结合亲和力在立赞利珠单抗的结合亲和力的80%至125%之内。

[0060] 在一个实施例中,异立赞利珠单抗的生物活性与立赞利珠单抗的生物活性基本上相等。术语“立赞利珠单抗的生物活性”是指立赞利珠单抗抑制人P-选择蛋白与其配体PSGL-1(P-选择蛋白糖蛋白配体-1)相互作用的能力,通常是抑制表达人P-选择蛋白的细胞与PSGL-1相互作用。生物活性可以通过常规方法确定。合适地,通过测量微量滴定板的荧光信号来确定生物活性,这些微量滴定板的孔首先被PSGL-1包被,然后在将在其表面表达人P-选择蛋白的哺乳动物细胞进行荧光标记后与这些细胞一起孵育,并与包含在本发明的药物组合物中的SEG101一起孵育。实例2.1证明了测量SEG101或其变体的生物活性的合适方法。在上下文中的术语“基本上相等”应理解为立赞利珠单抗和异立赞利珠单抗的生物学活性相差不超过2倍、合适地不超过1.5倍、合适地不超过1.3倍、合适地不超过1.2倍。合适地,异立赞利珠单抗的生物活性在立赞利珠单抗的生物活性的80%至125%之内。

[0061] 在另一方面,本发明提供了立赞利珠单抗的分离的变体(立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺),该立赞利珠单抗分别包含SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9中的轻链和重链氨基酸序列,其中SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸在至少一个轻链中被琥珀酰亚胺替换,而在另一个轻链上的相应位置是天冬氨酸、异天冬氨酸或琥珀酰亚胺。

[0062] 在一个方面,本发明提供了一种包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺药物组合物,其中立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺能够水解为异立赞利珠单

抗和立赞利珠单抗。在一个实施例中，立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺能够在pH 7.4 ± 0.4 下水解为异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗。在一个实施例中，立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺能够在室温下（典型地在约 25°C 下）在pH 7.4 ± 0.4 下水解为异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗。在一个实施例中，立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺能够在生理条件下水解为异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗。术语“生理条件”应理解为pH 7.4 ± 0.4 ，温度在约 36.0°C 至约 40.0°C 之间，优选地在 36.5°C 至 38.0°C 之间，优选地约 36.5°C 至 37.5°C 。在一个实施例中，在生理条件下，在约2至约5小时内、合适地在约3至约5小时内、合适地在约3至约4小时内，约50%立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺水解为异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗。在一个实施例中，将立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺（例如静脉内）注射至受试者后被水解为异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗。

[0063] 在一个实施例中，在药物组合物中，立赞利珠单抗是通过CZE确定的主要种类。主要种类被理解为具有最大的AUC。

[0064] 在一个实施例中，在药物组合物中，异立赞利珠单抗是通过CZE测定的主要种类。

[0065] 在一个实施例中，药物组合物包含基本上相等量的立赞利珠单抗和异立赞利珠单抗。在上下文中使用的术语“基本上相等”是指异立赞利珠单抗的量在立赞利珠单抗的量的80%至125%之内，合适地在立赞利珠单抗的90%至110%之内。

[0066] 在一个实施例中，本发明的药物组合物保持在约 2°C 至约 8°C ，合适地约 5°C 。药物组合物合适地保存在冰箱中。在一个实施例中，本发明的药物组合物的温度为约 2°C 至约 8°C ，合适地为约 4°C 至约 6°C ，合适地为 5°C 。发现在位置32处的天冬氨酸的异构化随温度升高以更高的速度发生（如例如表6中所示）。在这样的温度条件下，优选地如作为CZE测试中主峰的AUC所确定的，与起始材料相比（即在制备药物组合物时的时间处），立赞利珠单抗的减少经至少12个月的时间、合适地经18个月的时间，合适地经24个月的时间不超过25%、不超过20%、不超过15%、合适地不超过10%、合适地不超过5%。在这样的温度条件下，与起始材料相比，经至少12个月的时间、合适地经18个月的时间、合适地经24个月的时间，碱性变体的总量变化不超过15%、不超过10%、不超过5%、合适地不超过3%、合适地不超过2%。在这样的温度条件下，与起始材料相比，经至少12个月的时间、合适地经18个月的时间、合适地经24个月的时间，酸性变体的总量不增加超过25%，不超过15%，合适地不超过10%，合适地不超过5%。如果药物组合物具有适当的pH范围，则可以进一步最小化上述变化。例如pH在约5.5至约7.5之间、合适地pH在约5.5至约7之间、合适地pH在约6至约7之间、合适地约 6 ± 0.3 。合适地，药物配制品保持在pH约6。

[0067] 在一个实施例中，本发明提供了一种药物组合物，其包含总电荷变体的至少24%、至少30%、至少35%主峰和至多56%、至多50%、至多45%酸性变体，合适地在18个月或24个月保质期时，合适地药物组合物保持在约 2°C 至约 8°C ，合适地约 5°C 。在一个实施例中，本发明提供了一种药物组合物，其包含总电荷变体的至少24%主峰和至多56%酸性变体，合适地在18个月或24个月保质期时，合适地药物组合物保持在约 2°C 至约 8°C ，合适地约 5°C 。

[0068] 在一个实施例中，本发明提供了一种药物组合物，其包含总电荷变体的至少24%、至少30%、至少35%主峰，至多56%、至多50%、至多45%酸性变体，至多35%、至多30%、至多25%碱性变体，合适地在18个月或24个月保质期时，合适地药物组合物保持在约 2°C 至约 8°C ，合适地约 5°C 。在一个实施例中，本发明提供了一种药物组合物，其包含总电荷变体的

至少24%主峰、至多56%酸性变体和至多35%碱性变体,合适地在18个月或24个月保质期时,合适地药物组合物保持在约2°C至约8°C,合适地约5°C。

[0069] 质谱分析(MS)用于鉴定化学修饰,包括 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 。在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量中的至少50% LC_D 。在一个实施例中,本发明提供了药物组合物,其包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量中的约60%至约85% LC_D 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期前3个月内包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量的约70%至约85% LC_D 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期的12个月、合适地保质期的18个月、合适地保质期24个月后包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量的约60%至约70% LC_D 。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_D 的药物组合物,其中从保质期开始到保质期结束(其中保质期是12个月、合适地为18个月、合适地为24个月), LC_D 的减少百分比相对于 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量不超过约30%、不超过20%、合适地不超过15%。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_D 的药物组合物,其中对于至少约18个月的时间, LC_D 的减少百分比相对于 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量不超过约20%。合适地药物组合物保持在约2°C至约8°C,合适地保持在约5°C。如果药物组合物具有适当的pH范围,则可以进一步最小化上述变化。例如pH在约5.5至约7.5之间、合适地pH在约5.5至约7之间、合适地pH在约6至约7之间、合适地约 6 ± 0.3 。合适地,药物配制品保持在pH约6。

[0070] 在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量中的至少10% LC_{isod} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量中至多30% LC_{isod} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量的约10%至约30%、合适地约15%至约25%、合适地约20%至约30% LC_{isod} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期前3个月内包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量的少于约25% LC_{isod} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期12个月、合适地18个月、合适地保质期24个月后,包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量的约25% LC_{isod} 。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_{isod} 的药物组合物,其中从保质期开始到保质期结束(其中保质期是12个月、合适地为18个月保质期、合适地为24个月), LC_{isod} 的变化百分比相对于 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量不超过30%、不超过20%、不超过10%、合适地不超过5%。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_{isod} 的药物组合物,其中对于至少约18个月的时间, LC_D 的变化百分比相对于 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量不超过约20。合适地药物组合物保持在约2°C至约8°C,合适地保持在约5°C。如果药物组合物具有适当的pH范围,则可以进一步最小化上述变化。例如pH在约5.5至约7.5之间、合适地pH在约5.5至约7之间、合适地pH在约6至约7之间、合适地约 6 ± 0.3 。合适地,药物配制品保持在pH约6。

[0071] 在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量中的至少1% LC_{succ} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量中至多10% LC_{succ} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 的总量的约1%至约10% LC_{succ} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期前三个月内包含 LC_D 、 LC_{isod} 和 LC_{succ} 总量的少于约3% LC_{succ} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期12个月、

合适地18个月、合适地24个月后,包含 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 总量的约5% LC_{succI} 。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_{succI} 的药物组合物,其中从保质期开始到保质期结束(其中保质期是12个月、合适地为18个月、合适地为24个月), LC_{succI} 的改变百分比相对于 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 的总量不超过约20%、不超过10%、合适地不超过5%。在一个实施例中,本发明提供了一种包含 LC_{succI} 的药物组合物,其中对于至少约18个月的时间, LC_{succI} 的变化百分比相对于 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 的总量不超过约10%。合适地药物组合物保持在约2°C至约8°C,合适地保持在约5°C。如果药物组合物具有适当的pH范围,则可以进一步最小化上述变化。例如pH在约5.5至约7.5之间、合适地pH在约5.5至约7之间、合适地pH在约6至约7之间、合适地约 6 ± 0.3 。合适地,药物配制品保持在pH约6。

[0072] 在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含通过MS测定的 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 的总量的约60%至80% LC_D 、约15%至30% LC_{isoD} 和约1%至10% LC_{succI} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期前三个月内包含 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 的总量的约70%至80% LC_D 、约20%至25% LC_{isoD} 和约1%至3% LC_{succI} 。在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其在保质期12个月、合适地为18个月,合适地为24个月后,包含 LC_D 、 LC_{isoD} 和 LC_{succI} 的总量的约60%至70% LC_D 、约20%至30% LC_{isoD} 和约5%至10% LC_{succI} 。合适地药物组合物保持在约2°C至约8°C,合适地保持在约5°C。如果药物组合物具有适当的pH范围,则可以进一步最小化上述变化。例如pH在约5.5至约7.5之间、合适地pH在约5.5至约7之间、合适地pH在约6至约7之间、合适地约 6 ± 0.3 。合适地,药物配制品保持在pH约6。

[0073] 因此,在一个实施例中,本发明的药物组合物还包含缓冲液系统。

[0074] 本发明涉及一种新颖药物组合物,其包含立赞利珠单抗或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体作为活性成分,以及缓冲液系统,其中该药物组合物的pH值为约5.0至7.5、约5.5至7.0、约5.5至7.5、约5.5至7.0、约5.5至6.8、约5.5至6.5、约5.7至6.8、约5.7至6.5、约5.7至6.3、约5.9至6.1、或约6.0。在特定的方面,pH是在以上列举的那些之内的任何pH值;例如5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2和6.3。

[0075] 适用于本发明的缓冲液系统包括但不限于有机酸盐,例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris、氨丁三醇盐酸盐或磷酸盐缓冲液。优选地,缓冲液系统是柠檬酸缓冲液或磷酸盐缓冲液或其组合。另外,氨基酸组分(例如,甘氨酸),也可用作缓冲剂。氨基酸可以D-和/或L-形式存在,但L-形式是典型的。优选地,缓冲液系统不包含精氨酸或组氨酸。

[0076] 根据本发明,用于配制品的合适的缓冲液系统的浓度为约10mM至约100mM、约10mM至约50mM或约10mM至约40mM,这取决于例如缓冲液和所需的配制品稳定性。在优选的实施例中,缓冲液系统是柠檬酸盐,并且柠檬酸盐优选以10mM至50mM,优选地为15mM至40mM、优选20mM至30mM的浓度使用。在另一个优选的实施例中,缓冲液系统是磷酸盐,并且磷酸盐优选以10mM至50mM、优选地15mM至40mM,优选地20mM至30mM的浓度使用。在一个实施例中,柠檬酸盐或磷酸盐缓冲液的抗衡离子是钠和/或钾。在优选的实施例中,缓冲液是柠檬酸钠缓冲液。

[0077] 用于本发明的合适的稳定剂可以例如用作粘度增强剂、增溶剂、等渗剂和/或类似物。稳定剂可以是离子的,但是优选是非离子的(例如糖)。糖包括但不限于单糖,例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;

多糖,例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等;以及糖醇,例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)等。糖可以是糖醇或氨基糖。优选地,糖不是还原糖。还原糖包括但不限于所有单糖、乳糖、麦芽糖和纤维二糖。因此,糖优选是非还原糖,例如蔗糖、海藻糖、棉子糖、山梨糖醇和甘露糖醇。蔗糖特别有用。作为离子稳定剂,它们包括盐例如NaCl或氨基酸组分。优选地,稳定剂不包含精氨酸或组氨酸。氨基酸可以D-和/或L-形式存在,但L-形式是典型的。根据本发明的配制品包含约50mM至400mM、约50mM至300mM,优选180mM至300mM,最优选约220mM的稳定剂,优选为蔗糖。

[0078] 除了立赞利珠单抗或与立赞利珠单抗具有最多3个氨基酸差异的抗体和缓冲系统外,本发明的药物组合物还可包含其他组分,例如以下一种或多种:(i) 稳定剂;(ii) 表面活性剂;和(iii) 盐。

[0079] 根据本发明的合适的表面活性剂是非离子型表面活性剂,包括但不限于聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20或80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188);曲通(Triton);辛基糖苷;肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰丙基-或异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺;聚乙二醇、聚丙二醇以及乙二醇与丙二醇的共聚物(例如普郎尼克(Pluronic),PF68等)。在优选的实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯,优选地选自自由以下组成的组:聚山梨醇酯20和聚山梨醇酯80。更优选地,表面活性剂是聚山梨醇酯80。

[0080] 用于根据本发明的配制品的表面活性剂(优选聚山梨醇酯)的浓度为配制品的约0.01%至0.1%,优选地约0.01%至0.05%,最优选地约0.02%容积重量(w/v)。

[0081] 等渗剂用于将根据本发明的配制品的渗透压设定为生理上可接受的值。等渗剂是生理上可接受的组分,并且没有特别限制。等渗剂的典型实例是例如无机盐(例如氯化钠、氯化钾或氯化钙等)。这些可以单独使用或以其混合物使用。应当指出,某些试剂可能具有双重作用,例如某些糖或糖醇既可以用作稳定剂又可以用作等渗剂。在一个实施例中,等渗剂的浓度为约50mM至约300mM。在一个实施例中,等渗剂是氯化钠。在一个实施例中,氯化钠的浓度为约100mM至约250mM,特别是约190mM。

[0082] 在一个实施例中,本发明药物组合物中抗体的浓度为约1mg/ml至100mg/ml、约5mg/ml至100mg/ml、约5mg/ml至75mg/ml、约5mg/ml至50mg/ml、约5mg/ml至30mg/ml。在一个实施例中,抗体的浓度为至少5mg/ml。在一个实施例中,抗体的浓度为至少10mg/ml。在一个实施例中,抗体的浓度为至少20mg/ml。在一个实施例中,抗体的浓度为约10mg/ml。除非上下文另有说明,否则本文中所用的术语“抗体(antibody)”或其可互换使用的术语“抗体(ANTIBODY)”包含由药物组合物包含的立赞利珠单抗及其任何变体(例如立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺和异立赞利珠单抗),该药物组合物可被UV检测并且因此与确定蛋白质浓度有关。

[0083] 此外,本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在2°C-8°C下储存36周(约9个月)后,按照测量(例如,通过SEC-HPLC测量),低于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在2°C-8°C下储存36周(约9个月)后,低于2%的总抗体聚集。

[0084] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在2°C-8°C下储存12个月后,按照测量(例如,通过SEC-HPLC测量),低于10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在2°C-8°C下储存12个月后,低于2%的总抗体聚集。

[0085] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在2°C-8°C下储存15个月后,按照测量

(例如,通过SEC-HPLC测量),低于10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在2℃-8℃下储存15个月后,低于2%的总抗体聚集。

[0086] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在2℃-8℃下储存18个月后,按照测量(例如,通过SEC-HPLC测量),低于10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在2℃-8℃下储存18个月后,低于2%的总抗体聚集。

[0087] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在2℃-8℃下储存24个月后,按照测量(例如,通过SEC-HPLC测量),低于10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在2℃-8℃下储存24个月后,低于2%的总抗体聚集。

[0088] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在25℃下储存12周(约3个月)后,通过SEC-HPLC测量,低于5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在25℃下储存12周(约3个月)后,低于2%的总抗体聚集。

[0089] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在25℃下保存6个月后,如通过SEC-HPLC测量,低于5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在25℃下储存6个月后,低于2%的总抗体聚集。

[0090] 本发明的药物组合物是稳定的,使得即使在40℃下储存2周后,通过SEC-HPLC测量,低于20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%的总抗体聚集。优选地,在40℃下储存2周后,低于2%的总抗体聚集。

[0091] 在一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含:

[0092] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,或与立赞利珠单抗及其任何变体具有最多3个氨基酸差异的抗体;以约5mg/ml至50mg/ml的浓度使用;

[0093] b) 缓冲系统,优选柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)和/或磷酸盐(例如磷酸钾)缓冲液系统,其中缓冲液系统可以优选以约10mM至50mM的浓度使用;并且其中缓冲液系统的pH为5.0至7.5,优选地为5.5至7.0,优选5.7至6.3之内的任何pH值;

[0094] c) 任选地,稳定剂,优选蔗糖,其浓度优选为约50mM至300mM;

[0095] d) 任选地,非离子表面活性剂,优选聚山梨醇酯80,其浓度优选为约0.01%w/v(0.1mg/ml)至0.1%w/v(1mg/ml);和

[0096] e) 任选地,等渗剂,优选NaCl,其浓度优选为约50mM-300mM,更优选为约100mM-250mM,特别是约190mM。

[0097] 在优选的实施例中,本发明提供了一种配制品,其包含浓度为约10mg/ml的SEG101、约220mM蔗糖、约20mM柠檬酸盐和约0.02%w/v聚山梨醇酯80,其中该配制品的pH为约6.0、优选为5.7至6.3、更优选5.9至6.1,例如6.0。

[0098] 在一个实施例中,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物不是包含浓度约10mg/ml的立赞利珠单抗、约25mM磷酸钠、pH约7、约190mM氯化钠,约0.02%w/v聚山梨醇酯80和注射用水的配制品。

[0099] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物不包含甘氨酸。

[0100] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物不包含磷酸钠。

[0101] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物不具有pH=7。

[0102] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0103] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物还包含蔗糖。在一个实施例中,药物组合物包含至少50mM蔗糖。

[0104] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和琥珀酰亚胺的总量为约5mM至50mM、合适地为5mM至30mM、合适地为10mM。

[0105] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物还包含表面活性剂。在一个实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯。在一个实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯80。在一个实施例中,药物组合物包含至少0.01%表面活性剂。

[0106] 在一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含立赞利珠单抗、异立赞利珠单抗和立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺(例如如上所述),其中该药物组合物还包含缓冲系统。在一个实施例中,缓冲系统是柠檬酸盐缓冲液。在一个实施例中,药物组合物包含10mM至50mM的柠檬酸盐缓冲液。

[0107] 在优选的实施例中,本发明的药物组合物呈液体形式。更优选地,所述组合物是水性的,即溶剂是水。适用于药物用途的配制品或组合物可以是无菌的、均质的和/或等渗的。在优选的实施例中,本发明的药物组合物适合于静脉内施用于人。但是,本发明的药物组合物可能不适合皮下施用。

[0108] 在一个实施例中,液体形式的本发明的药物组合物也适用于冻干。典型地,冻干形式比液体形式更稳定,并且将是优选的储存形式。但是,如果液体形式足够稳定至少12个月、至少18个月或至少24个月的时间,理想地是12个月、18个月或24个月的时间,则液体形式是方便使用的优选。

[0109] 在一个实施例中,本发明的药物组合物为冻干形式,其包含立赞利珠单抗或与立赞利珠单抗具有最多3个、优选2个、更优选仅一个氨基酸差异的抗体,优选地是具有分别为SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:9中的轻链和重链氨基酸序列的立赞利珠单抗,以及立赞利珠单抗变体(异立赞利珠单抗),在该立赞利珠单抗变体中,SEQ ID NO:10的位置32处的氨基酸天冬氨酸改变为异天冬氨酸。在一个实施例中,药物组合物还包含立赞利珠单抗的琥珀酰亚胺。

[0110] 在一个实施例中,经受冻干的液体配制品(冻干前配制品)进一步包含缓冲系统,其中该药物组合物的pH值为约5.0至7.5、约5.5至7.5、约5.5至7.0、约5.5至6.8、约5.5至6.5、约5.7至6.8、约5.7至6.5、约5.7至6.3、约5.9至6.1、或约6.0。在特定的方面,pH是在以上列举的那些之内的任何pH值;例如5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2和6.3。

[0111] 在另一个实施例中,从冻干配制品重构的配制品的pH值为约5.5至7.5、约5.5至7.0、约5.5至6.8、约5.5至6.5、约5.7至6.8、约5.7至6.5、约5.7至6.3、约5.9至6.1、或约6.0。在特定的方面,pH是在以上列举的那些之内的任何pH值;例如5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、

6.2和6.3。

[0112] 在一个实施例中,缓冲液系统是柠檬酸盐缓冲液或磷酸盐缓冲液。在优选的实施例中,缓冲液系统是柠檬酸盐,并且柠檬酸盐优选以10mM至50mM,优选地为15mM至40mM、优选20mM至30mM的浓度使用。在另一个优选的实施例中,缓冲液系统是磷酸盐,并且磷酸盐优选以10mM至50mM、优选地15mM至40mM,优选地20mM至30mM的浓度使用。

[0113] 在一个实施例中,冻干形式的本发明的药物组合物还包含赋形剂,包括但不限于本申请前面所教导的稳定剂、表面活性剂和等渗剂。在一个实施例中,冻干形式包含稳定剂。优选地,稳定剂是蔗糖。在一个实施例中,冻干前配制品中的蔗糖浓度在20mg/ml至120mg/ml之间、合适地在40mg/ml至100mg/ml之间、合适地在60mg/ml至90mg/ml之间。

[0114] 在一个实施例中,冻干形式的本发明的药物组合物还包含冻干保护剂。通常,将冻干保护剂添加到冻干前配制品中。冻干保护剂可以是无定形形式,例如蔗糖,或结晶形式,例如甘露糖醇,或其混合物。其他冻干保护剂包括但不限于甘氨酸、聚乙二醇和山梨糖醇。在根据本发明的冻干前配制品中总冻干保护剂的浓度为20mg/ml-150mg/ml、合适地为40mg/ml-120mg/ml、合适地为60mg/ml-120mg/ml、合适地为60mg/ml-100mg/ml。例如,如果在冻干前配制品中有40mg/ml蔗糖和60mg/ml甘露醇,则在冻干前配制品中总冻干保护剂的浓度为100mg/ml。在具有双重功能的赋形剂的情况下,计算采用总量而不区分功能。例如,如果冻干前配制品包含40mg/ml蔗糖,则冻干保护剂的浓度为40mg/ml,并且同时稳定剂的浓度为40mg/ml。

[0115] 在一个实施例中,冻干保护剂中的至少一种是蔗糖。在一个实施例中,唯一的冻干保护剂是蔗糖。

[0116] 在一个实施例中,冻干保护剂与抗体的摩尔比为至少300、优选至少500、优选至少600、至少700、至少800或至少900。在其中冻干保护剂中的至少一种是蔗糖的情况下,冻干保护剂与抗体的摩尔比仅是指蔗糖与抗体的摩尔比。例如,在包含40mg/ml蔗糖和60mg/ml甘露醇的冻干前配制品中,冻干保护剂与抗体的摩尔比为553,这没有考虑到甘露醇作为冻干保护剂的量。在抗体的计算中,包括主峰在内的所有电荷变体都算在一起,其优选地通过UV确定。例如,在包含30mg/ml SEG101的冻干前配制品的情况下,这是指总电荷变体,包括主峰(立赞利珠单抗)。

[0117] 在一个实施例中,冻干前配制品中抗体的浓度为约10mg/ml至100mg/ml、约10mg/ml至70mg/ml、约20mg/ml至70mg/ml、约30mg/ml至50mg/ml,例如约40mg/ml。

[0118] 使用表面活性剂可以减少重构蛋白质的聚集和/或减少重构配制品中颗粒的形成。加入的表面活性剂的量应使其减少重构蛋白质的聚集并使重构后的颗粒形成最小化。

[0119] 可以根据需要将表面活性剂添加至冻干前配制品、冻干配制品和/或重构的配制品中,合适地添加至冻干前配制品中。

[0120] 在一个实施例中,表面活性剂是非离子表面活性剂。在一个实施例中,表面活性剂是聚山梨醇酯,优选聚山梨醇酯80或聚山梨醇酯20。优选地,表面活性剂的浓度为0.01%w/v (0.1mg/mL)至0.1%w/v (1mg/mL)、优选0.01%w/v (0.1mg/mL)至0.05%w/v (0.5mg/mL)、优选0.02%w/v (0.2mg/mL)。

[0121] 理想地,冻干形式存储在室温下。可替代地,冻干形式存储在2°C-8°C。理想地,冻干形式具有至少18个月、至少24个月或至少36个月的保质期。理想地,冻干形式具有18个

月、24个月或36个月的保质期。

[0122] 冻干配制品可以在施用于患者之前不久重构。在可接受的时间段(典型地少于10分钟)内完成重构。与冻干前配制品相比,重构导致更低、相同或更高的抗体浓度,但是通常导致更低的抗体浓度。重构的配制品在从重构到使用的一段时间内,通常几小时到几天,基本上保持了物理及化学稳定性和完整性。

[0123] 重构介质选自水,即无菌水,注射用抑菌水(BWFI)或由以下组成的组:乙酸、丙酸、琥珀酸、氯化钠、氯化镁、氯化钠的酸性溶液、氯化镁的酸性溶液、和精氨酸的酸性溶液,其量为约50mM至约100mM。最优选的重构介质是无菌水。通过在施用前用输注溶液稀释重构的配制品,重构的配制品可达到所需等渗性。

[0124] 在一个方面,本发明提供了一种冻干配制品,其可通过冻干pH值为约5.0至7.5,优选为5.5至7.5的水性配制品而获得,其中该冻干配制品包含:

[0125] a) 抗体(立赞利珠单抗及其任何变体);

[0126] b) 冻干保护剂;和

[0127] c) 缓冲液系统。

[0128] 在一个实施例中,冻干配制品还包含表面活性剂,优选聚山梨醇酯40或聚山梨醇酯80。优选地,表面活性剂以约0.01%w/v(0.1mg/mL)至0.1%w/v(1mg/mL)的浓度存在于水性配制品中。

[0129] 在一个实施例中,抗体以约10mg/mL至100mg/mL的浓度存在于水性配制品中。

[0130] 在一个实施例中,缓冲液系统是柠檬酸盐,例如柠檬酸钠。优选地,缓冲液系统以约10mM至50mM的浓度存在于水性配制品中。

[0131] 在一个实施例中,冻干保护剂是蔗糖、甘露醇或其混合物。优选地,冻干保护剂以约10mg/mL至100mg/mL的浓度存在于水性配制品中。

[0132] 在一个实施例中,冻干保护剂(优选蔗糖)与抗体的摩尔比为约200至1500。

[0133] 在一个实施例中,本发明提供了一种冻干配制品,其包含

[0134] a) 约25w/w%-40w/w%,优选约28%至32w/w%的抗体;和

[0135] b) 约55%至75w/w%,优选约65%至71w/w%的蔗糖,

[0136] 这是基于该冻干配制品的总重量。

[0137] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH并且包含

[0138] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约30mg/mL至约50mg/mL;

[0139] b) 蔗糖,其浓度为约10mg/mL至100mg/mL;

[0140] c) 任选地,甘露醇,其浓度高达100mg/mL;

[0141] d) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和

[0142] e) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v(0.2mg/mL)。

[0143] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含

[0144] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约30mg/mL;

[0145] b) 蔗糖,其浓度为约90mg/mL;

[0146] c) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和

- [0147] d) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0148] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含
- [0149] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约40mg/mL;
- [0150] b) 蔗糖,其浓度为约90mg/mL;
- [0151] c) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和
- [0152] d) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0153] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含
- [0154] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约50mg/mL;
- [0155] b) 蔗糖,其浓度为约40mg/mL;
- [0156] c) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和
- [0157] d) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0158] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含
- [0159] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约30mg/mL;
- [0160] b) 蔗糖,其浓度为约20mg/mL;
- [0161] c) 甘露醇,其浓度为约40mg/mL;
- [0162] d) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和
- [0163] e) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0164] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含
- [0165] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约30mg/mL;
- [0166] b) 蔗糖,其浓度为约40mg/mL;
- [0167] c) 甘露醇,其浓度为约80mg/mL;
- [0168] d) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和
- [0169] e) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0170] 在一个实施例中,冻干配制品可通过冻干水性配制品获得,其中水性配制品具有约5.7至6.3的pH,优选约pH 6.0,并且包含
- [0171] a) 立赞利珠单抗及其任何变体,其浓度为约30mg/mL;
- [0172] b) 蔗糖,其浓度为约40mg/mL;
- [0173] c) 甘露醇,其浓度为约60mg/mL;
- [0174] d) 柠檬酸盐(例如柠檬酸钠),其浓度为约20mM;和
- [0175] e) 聚山梨醇酯80,其浓度为约0.02%w/v (0.2mg/mL)。
- [0176] 在一个方面,本发明提供了一种通过重构如上所述的冻干配制品而获得的液体药物组合物。
- [0177] 本发明的一个目的是提供在储存时间内稳定的抗体配制品。根据本发明,稳定的配制品一种配制品,其中的抗体在储存后基本上保留其效力以及物理/化学稳定性和完整性。抗体配制品的稳定性可以使用生物活性测定来测量。优选地,与开始时间相比(即T=

0),在长期储存条件(2°C-8°C)下储存24或36周、或12个月、15个月、18个月或24个月后,抗体活性的降低小于20%、更优选小于15%、更优选小于10%、更优选小于5%。就SEG101而言,生物学活性基于其抑制表达人P-选择蛋白的细胞与其配体PSGL-1(例如经重组修饰以在其表面呈递人P-选择蛋白的哺乳动物细胞与重组人PSGL-1)相互作用的能力来测定。合适地,通过测量微量滴定板的荧光信号来确定生物活性,这些微量滴定板的孔首先被PSGL-1包被,然后在将在其表面表达人P-选择蛋白的哺乳动物细胞进行荧光标记后与这些细胞一起孵育,并与包含在本发明的药物组合物中的SEG101一起孵育。实例2.1证明了测量SEG101或其变体的生物活性的合适方法。

[0178] 在一个实施例中、本发明的药物组合物如上所述在长时间的储存期间显示出不可检测的或仅非常低水平的抗体聚集。在优选的实施例中,例如通过尺寸排阻色谱(SEC)在2°C-8°C下储存6周、12周、24周、36周、48周、一年或18个月或24个月后测定,配制品中至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的抗体分子以单体形式存在。最优选地,在2°C-8°C下储存36周或一年、18个月或24个月后,配制品中至少97%的抗体分子以单体形式存在。优选地,如实例3中所述执行SEC。

[0179] 优选地,液体抗体配制品应表现出6个月或更长的保质期。本发明的药物组合物优选地在2°C-8°C下保存时,表现出保质期至少9个月(例如9个月)、至少一年(例如1年)、至少18个月(例如18个月)或长达2年(例如24个月)。优选地,药物组合物表现出约12个月、18个月或合适地24个月的保质期。决定保质期主要因素通常是副产物和降解产物的形成以及生物活性的丧失。在其保质期内,立赞利珠单抗的生物活性应保持在原始活性的80%和125%之间。本发明的配制品达到这些所需的稳定性水平。

[0180] 抗P-选择蛋白抗体

[0181] 针对人P-选择蛋白的抗体从例如WO 2008/069999中是已知的和包括具有如下特征的抗体:分别包含SEQ ID NO 1、2和3的重链CDR1、CDR2和CDR3以及SEQ ID NO 4、5和6的轻链CDR1、CDR2和CDR3。针对人P-选择蛋白的抗体的特征还在于包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的V_H结构域和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的V_L结构域。特别地,SEG101是针对P-选择蛋白的人源化单克隆抗体,其包含SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:10的轻链。该抗体以高亲和力和特异性结合至位于P-选择蛋白氨基末端的凝集素结合结构域,并阻断P-选择蛋白与其受体P-选择蛋白糖蛋白配体1(PSGL-1)的相互作用。

[0182] 立赞利珠单抗是针对人P-选择蛋白的人源化单克隆抗体,并且在参考文献WO 2018/083645 A1中也有所描述。立赞利珠单抗的特征在于包含SEQ ID NO:9的重链和SEQ ID NO:10的轻链。表1总结了SEG101的序列特征。

[0183] 表1. SEG101的氨基酸序列说明。

SEQ ID NO.	描述	序列
1	重链 CDR1	SYDIN
2	重链 CDR2	WIYPGDGSIKYNEKFKG
3	重链 CDR3	RGEYGNIEGAMDY
4	轻链 CDR1	KASQSVDDYDGHSYMN
5	轻链 CDR2	AASNLES
6	轻链 CDR3	QQSDENPLT
7	重链可变区 (V _H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKVSGYTFTSYDINWVRQA PGKGLEWGMWIIYPGDGSIKYNEKFKGRVTMTVDKSTDTAY MELSSLRSEDTAVYYCARRGEYGNIEGAMDYWGQGTLLVTV SS
8	轻链可变区 (V _L)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGHSYMNWY QQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSDENPLTFGGGTKVEIKR
[0184] 9	重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKVSGYTFTSYDINWVRQA PGKGLEWGMWIIYPGDGSIKYNEKFKGRVTMTVDKSTDTAY MELSSLRSEDTAVYYCARRGEYGNIEGAMDYWGQGTLLVTV SSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGT QTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPVAGPS VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV DGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCAVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
10	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVDDYDGHSYMNWY QQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSDENPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

[0185] 靶疾病和障碍

[0186] 本发明的药物组合物可用于治疗、改善或预防多种疾病或障碍。本发明的药物组合物特别可用于治疗P-选择蛋白介导的或P-选择蛋白相关的障碍，特别是减少或消除与瓣状细胞病有关的血管闭塞、炎症和疼痛危险；参见例如WO 2018/083645 A1和WO 2008/069999 A2。

[0187] 在本发明的上下文中，术语“P-选择蛋白介导的障碍”或“P-选择蛋白相关的障碍”是指与P-选择蛋白/PSGL-1复合物水平升高相关或以其为特征的障碍。抗P-选择蛋白抗体或其结合片段可以具有减少P-选择蛋白/PSGL-1复合物形成的能力。它们还可以具有解离预先形成的P-选择蛋白/PSGL-1复合物的能力。因此，应理解，使用本发明的包含抗P-选择蛋白抗体或其结合片段的药物组合物允许通过抑制新的P-选择蛋白/PSGL-1复合物的形成来预防P-选择蛋白介导的障碍。还应理解，所述配制品的使用允许通过解离预先形成的P-选择蛋白/PSGL-1复合物来治疗已有的P-选择蛋白介导的障碍。合适地，减少P-选择蛋白/PSGL-1复合物的形成和此类复合物的解离在细胞与细胞之间的相互作用期间发生。因此，合适地由本文所述的抗P-选择蛋白抗体或其结合片段预防的障碍是与细胞和细胞之间的

相互作用中P-选择蛋白/PSGL-1复合物水平升高有关的障碍。

[0188] 在广泛的障碍和/或症状中可以观察到P-选择蛋白/PSGL-1复合物的水平升高。尤其是在患有炎症疾病和/或血栓形成疾病和/或症状的受试者中或来自患有炎症疾病和/或血栓形成疾病和/或症状的受试者的样品中观察到它们。因此,包含抗P-选择蛋白抗体或其结合片段的本发明药物组合物可用于治疗障碍,例如选自由以下组成的组的炎症疾病和/或血栓形成疾病:镰状细胞病、镰状细胞痛危象、关节炎(例如类风湿性关节炎、骨关节炎和牛皮癣性关节炎)、移植物排斥、移植物抗宿主病、哮喘,慢性阻塞性肺疾病、牛皮癣、皮炎、败血症、肾炎、红斑狼疮、硬皮病、鼻炎、过敏性反应、糖尿病、多发性硬化症、动脉粥样硬化、血栓形成、肿瘤转移、过敏反应、甲状腺炎、缺血再灌注损伤(例如由于心肌梗塞、中风或器官移植引起)、癌症(例如多发性骨髓瘤)和与广泛创伤或慢性炎症相关的病症(例如IV型迟发型超敏反应)、与例如结核杆菌感染相关的病症、或系统性炎症应答综合征或多器官衰竭。

[0189] 镰状细胞病患者可能经历镰状细胞疼痛危象。本发明的包含抗P-选择蛋白抗体或其结合片段的药物组合物可在治疗和预防受试者的镰状细胞病中的血管闭塞性疼痛危象中具有特殊用途。合适地,镰状细胞病患者具有选自下组的基因型,该组由以下组成:HbSS、HbSC、HbS β 0地中海贫血和HbS β 0+地中海贫血。

[0190] 患者施用

[0191] 本发明的目的是提供本发明的配制品在治疗P-选择蛋白介导的疾病或医学病症中的用途。它提供了一种治疗P-选择蛋白介导的疾病或医学病症(合适地是镰状细胞病)的方法,该方法包括将本发明的药物组合物施用给有需要的受试者的步骤。本发明的药物组合物可用于预防和/或治疗P-选择蛋白介导的疾病或医学病症,例如炎症疾病和血栓形成疾病、肿瘤转移,尤其是减少或消除与镰状细胞病相关的血管闭塞、炎症和疼痛危象,并优选采用W0 2018/083645 A1第13页第3段至第19页第3段中所述的给药方案,所述页面以引用方式并入本文。本发明的配制品可以作为单独的治疗或与可用于治疗上文所述病症的其他药物或疗法联合施用。

[0192] 在一个方面,本发明涉及药物组合物,其用于治疗 and/或预防P-选择蛋白介导的疾病或医学病症,例如用于预防镰状细胞疼痛危象,其中首先在负荷阶段提供该组合物,在负荷阶段期间受试者接受以5mg/kg至7.5mg/kg的量的两个负荷剂量的抗体,并且其中两个负荷剂量之间的时间间隔为2周(+/-3天),然后进一步在维持阶段中提供该组合物,在维持阶段期间受试者接受以5mg/kg至7.5mg/kg的量的多个维持剂量的抗体,并且其中多个维持剂量之间的时间间隔为4周。

[0193] 在一个方面,本发明的药物组合物在小瓶中。

[0194] 在一个方面,通过静脉内途径将本发明的药物组合物施用于患者,典型地通过将其经由注射器转移至装有等渗溶液(例如0.9%NaCl或5%右旋糖)的输注容器(例如由塑料制成的输注袋)中以此进行输注。

[0195] 在一个实施例中,本发明的药物组合物优选通过静脉内途径,优选以5mg/kg的量,优选以相隔2周的2个负荷剂量,然后每4周的多个维持剂量,施用于受试者(通常为健康志愿者或患者)。在一个实施例中,测定了立赞利珠单抗及其任何变体在血清中的浓度,并且满足以下PK参数中的一个或多个或所有:

[0196] a) 在施用所述药物组合物后 t_{\max} 在0.4至10小时(h)的范围内,优选0.55h至6.25h,优选中位数为1.5至2.5h,优选1.92h;

[0197] b) 首个剂量后 C_{\max} 在 $116 \pm 91.3 \mu\text{g/mL}$ 的范围内;或优选地在稳定状态下为 $50 \mu\text{g/mL}$ 至 $200 \mu\text{g/mL}$,优选为 $124 \mu\text{g/mL} \pm 31.6 \mu\text{g/mL}$;

[0198] c) 表观 $t_{1/2}$ 在100h至300h的范围内,优选在150h至210h的范围内,例如约183h(7.6天);

[0199] d) $AUC_{\tau,ss}$ 在10000至30000 $\mu\text{g} \times \text{h/mL}$ 的范围内,优选在第15周时为 $20400 \mu\text{g} \times \text{h/mL}$,优选变异系数为23.5%。“tau”在这里是指给药间隔,因此, $AUC_{\tau,ss}$,稳定状态(ss)是从第15周第1天输注开始到第19周天输注之前的AUC;

[0200] e) 具有SCD且典型地体重为70kg的患者中在稳定状态第15周的平均清除率在10mL/h至30mL/h的范围内,优选15mL/h至20mL/h,例如约17.2mL/h;

[0201] f) 稳定状态下每4周(尤其是从第7周到第27周)获得的PK谷浓度在约 $3.78 \mu\text{g/mL}$ 至 $9.8 \mu\text{g/mL}$ 的范围内。另外,在前次输注后两周的第3周,谷浓度为约 $12 \mu\text{g/mL}$ 至约 $24 \mu\text{g/mL}$,优选约 $15 \mu\text{g/mL}$ 至约 $21 \mu\text{g/mL}$,优选约 $18.2 \mu\text{g/mL}$ 。

[0202] 立赞利珠单抗及其变体在血清中的浓度典型地离体测定,并且典型地通过ELISA测定,典型地使用P-选择蛋白作为诱饵。因此,该方法测量了所有能够与P-选择蛋白结合并且优选可以与测定中使用的抗人IgG抗体进一步结合的血清立赞利珠单抗及其变体。

[0203] 典型地,夹心ELISA用于检测人血清中的立赞利珠单抗及其任何变体。高结合免疫板包被有小鼠抗人P-选择蛋白抗体。然后将板用人P-选择蛋白包被。定量的立赞利珠单抗及其任何变体用于制备标准品和质量对照(QC)样品,然后添加到指定的样品孔中。结合的立赞利珠单抗的量可以通过以下来可视化:随后添加生物素化的山羊抗人IgG、与辣根过氧化物酶共价缀合的链霉亲和素蛋白(链霉亲和素-HRP)和发色底物四甲基联苯胺(TMB),并用分光光度计在450nm处检测该反应的产物。从标准校准曲线反算出血清样品中立赞利珠单抗及其变体的浓度。

[0204] 在一个实施例中,本发明的药物组合物优选通过静脉内途径,优选以5mg/kg的量,优选以相隔2周的2个负荷剂量,然后每4周的多个维持剂量,施用于受试者(通常为健康志愿者或患者),其中典型地由表面等离子体共振(SPR)测定所确定,血清中的立赞利珠单抗及其变体实现对P-选择蛋白与PSGL-1的结合的至少70%、至少80%、至少90%、至少95%的抑制。

[0205] 表面等离子体共振(SPR)测定是一种体外结合竞争测定。在不存在立赞利珠单抗及其任何变体的情况下,P-选择蛋白与其靶PSGL-1的结合产生可量化的信号,设置为100%。立赞利珠单抗及其任何变体的添加(例如通过添加本发明的药物组合物,或通过添加获自接受了本发明的药物组合物的人受试者的血清)抑制P-选择蛋白与PSGL-1的结合,从而导致信号降低,可以将其计算为抑制百分比。

[0206] 在SPR测定的一个实施例中,P-选择蛋白被与免疫球蛋白融合的P-选择蛋白(PSe1-Ig)取代,并且PSGL-1通过糖硫肽6(GSP6)(它表示PSGL-1的最小肽形式)仍能够结合PSe1-Ig。

[0207] 实例6描述了另一个SPR实施例。

[0208] 在一个方面,本发明的药物组合物包含立赞利珠单抗和异立赞利珠单抗,其中通

过使用药物组合物测定的IC50在约4 μ g/ml-7 μ g/ml的范围内,典型地约4.6 μ g/ml-6.2 μ g/ml,典型地约5.0 μ g/ml至5.7 μ g/ml,典型地约5.2 μ g/ml。在一个实施例中,IC50是在体外测定中确定的。

[0209] 实例

[0210] 实例1:SEG101的液体配制品的制备

[0211] SEG101可以例如通过WO 2008/069999中从第15页第20行至第18页第29行中所述的方法来生产,这些页面通过引用并入本文。表2显示了针对SEG101测试其适合性的配制品。样品B和C,以及样品F和G分别相同,以评估配制品中的变异性。

[0212] 表2. 经测试的配制品。

样品名称	SEG101 (mg/mL)	缓冲液	pH	稳定/等渗剂	聚山梨醇酯 80
A	10	磷酸钠 (25 mM)	7.0	190 mM NaCl	0.02%
B	10	磷酸钠 (25 mM)	7.0	220 mM 蔗糖	0.02%
C	10	磷酸钠 (25 mM)	7.0	220 mM 蔗糖	0.02%
D	50	磷酸钠 (25 mM)	7.0	220 mM 蔗糖	0.02%
E	10	磷酸钠 (25 mM)	7.0	150 mM L-精氨酸 HCl	0.02%
F	10	组氨酸 (20 mM)	6.0	220 mM 蔗糖	0.02%
G	10	组氨酸 (20 mM)	6.0	220 mM 蔗糖	0.02%
H	50	组氨酸 (20 mM)	6.0	220 mM 蔗糖	0.02%
I	10	组氨酸 (20 mM)	6.0	150 mM L-精氨酸 HCl	0.02%
J	10	磷酸钠 (20 mM)	6.0	220 mM 蔗糖	0.02%
K	10	柠檬酸钠 (20 mM)	6.0	220 mM 蔗糖	0.02%

[0213] 1 结果

[0214] 1.1 效力测定

[0215] 对于所有样品,通过ELISA和基于细胞的测定法测量的效力在稳定性研究开始时在预期范围之内。与参考物质相比,ELISA的当前规格是80%-125%相对生物学活性。

[0216] 通过结合ELISA进行的效力测定未显示任何样品或测定的稳定时间点的相关变化(表3)。在基于细胞的测定中(表4),对于所有含组氨酸和/或精氨酸的样品,在40 $^{\circ}$ C/2周和25 $^{\circ}$ C/12周时均观察到效力显著降低(表3)。磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的样品未显示出效力降低。

[0217] 在针对配制品K的单独实验中,通过ELISA和基于细胞的测定(使用与其他配制品相同的方法)在不同时间点测量了效力(表5)。

[0218] 表3. 通过结合ELISA(结合P-选择蛋白)测量的效力

样品	T = 0	T = 2	T = 12	T = 12	T = 24	T = 36
	[%相对 生物 活性]	周在 40°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]	周在 25°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]
A: pH 7, NaCl, 磷酸 盐 10 mg/mL	105	87	105	93	NT	NT
D: pH 7, 蔗糖, 磷酸 盐 50 mg/mL	106	97	94	84	NT	NT
[0220] E: pH 7, 精氨酸 HCl, 磷酸盐, 10 mg/mL	111	85	NT	NT	NT	NT
F: pH 6, 蔗糖, 组氨酸, 10 mg/mL	103	97	102	89/ 83*	103	106
H: pH 6, 蔗糖, 组氨 酸, 50 mg/mL	103	90	102	92	NT	NT
I: pH 6, 精氨酸 HCl, 组氨酸, 10 mg/mL	107	92	NT	NT	NT	NT
J: pH 6, 蔗糖, 磷酸钠, 10 mg/mL	NT	110	104	101/ 104*	110	103
K: pH 6, 蔗糖, 柠檬 酸盐, 10 mg/mL	NT	109	118	102/ 101*	112	108

[0221] NT:未测试

[0222] *重新分析

[0223] 表4. 基于细胞的测定的效力

样品名称	T = 0	T = 2	T = 12	T = 12	T = 24	T = 36
	[%相对 生物 活性]	周在 40°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]	周在 25°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]	周在 2°C-8°C [%相对 生物 活性]
[0224] A: pH 7, NaCl, 磷酸 盐 10 mg/mL	114	89	107	96	NT	NT
D: pH 7, 蔗糖, 磷酸 盐 50 mg/mL	102	82	105	89	NT	NT
E: pH 7, 精氨酸 HCl, 磷酸盐, 10 mg/mL	98	71	NT	NT	NT	NT
F: pH 6, 蔗糖, 组氨酸, 10 mg/mL	105	70	90	63/ 57*	93	101
H: pH 6, 蔗糖, 组氨 酸, 50 mg/mL	91	72	98	73	NT	NT
I: pH 6, 精氨酸 HCl, 组氨酸, 10 mg/mL	101	67	NT	NT	NT	NT
[0225] J: pH 6, 蔗糖, 磷酸钠, 10 mg/mL	NT	91	105	91/ 79*	101	108
K: pH 6, 蔗糖, 柠檬 酸盐, 10 mg/mL	NT	87	104	96/ 85*	97	101

- [0226] NT:未测试
 [0227] *重新分析
 [0228] 表5.通过ELISA和基于细胞测定测量的配制品K的效力。

	通过 ELISA 测量的与 P-选择蛋白结合[%]	表达 P-选择蛋白的哺乳动物细胞对 PSGL-1 的粘附的抑制[%]
初始分析 (T = 0)	100	99
5°C/环境 RH		
[0229] 1.5 个月	99	100
3 个月	95	99
6 个月	81	93
9 个月	100	105
12 个月	99	95
15 个月	96	92

- [0230] RH:相对湿度。
 [0231] 将样品保存在密封的小瓶中。实际上,小瓶外部的湿度与药物的稳定性无关。
 [0232] 1.2CZE的电荷变体
 [0233] 在长期储存条件下(2°C-8°C),电荷变体谱随时间的变化非常有限。但是,在加速(25°C)和压力(40°C)条件下变化非常明显。
 [0234] 1.2.1pH值对降解途径的影响
 [0235] CZE主峰的变化主要由温度驱动,并且在pH 6.0和pH 7.0设定点之间未观察到相关差异(图1,表6)。
 [0236] 表6.配制品pH值对CZE主峰的影响。A-K列中的值表示CZE图中的主峰%AUC。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T = 0)	38.2	38.3	38.4	38.1	39.0	37.9	37.7	38.3	38.1	38.1	38.0
5°C/环境											
RH											
2周	37.3	37.8	37.6	37.4	37.7	37.0	36.9	37.4	37.8	37.1	38.1
6周	37.3	37.8	37.8	37.2	37.9	37.9	37.7	37.3	36.9	36.7	36.7
12周	38.2	39.6	37.9	36.9	37.6	37.3	37.7	37.4	37.3	36.2	36.4
6个月	34.8	34.3	34.6	34.5	35.2	34.0	34.2	34.1	35.0	33.7	33.5
9个月	34.3	32.2	33.0	33.0	35.1	32.4	32.3	32.4	34.4	33.0	32.9
25°C/60%											
RH											
2周	33.0	32.5	32.1	31.5	33.1	31.5	31.3	31.6	32.2	31.5	32.1
6周	24.8	23.8	24.0	24.5 ¹	25.2	24.6	25.1	24.4	25.8	24.9 ¹	24.4
12周	14.9	14.5	14.3	14.6	16.4	18.1	18.4	17.0	19.8	16.8	17.0
40°C/75%											
RH											
2周	22.0	13.1	10.5	10.2	20.3	17.3	13.7	14.2	16.0	13.7	13.8

[0238] RH: 相对湿度。

[0239] 1) 主峰包括碱性0峰。

[0240] 与起始材料相比,观察到碱性变体在pH 6.0时增加,而在pH 7.0时随时间减少(图2,表7)。在pH值为6.0,在2°C-8°C时,碱性峰的水平几乎保持不变,而在pH值为7.0,在2°C-8°C时,则观察到缓慢但恒定的下降。在pH 6.0和7.0的加速条件下(25°C),似乎达到了平台期。

[0241] 表7. 配制品pH值对CZE碱性峰的影响。A-K列中的值表示CZE图中碱性变体的%AUC的总和。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T = 0)	22.1	22.6	23.2	23.0	23.3	24.8	24.6	24.5	25.4	25.1	24.9
5°C/环境											
RH											
2周	20.0	21.1	21.2	20.9	20.7	25.0	24.9	24.2	24.1	25.3	24.9
6周	19.0	19.5	19.8	19.6	19.8	24.6	24.5	25.3	25.3	25.1	25.7
12周	17.9	19.2	19.0	19.3	19.6	25.1	25.1	26.5	25.0	26.0	26.6
6个月	17.4	17.3	18.0	17.8	17.9	25.4	25.2	27.2	24.3	26.3	27.6
9个月	16.6	16.5	17.1	17.1	16.7	24.5	24.4	26.8	23.6	26.0	27.7
25°C/60											
% RH											
2周	16.3	17.6	17.4	17.4	17.1	30.2	30.1	30.4	29.1	28.7	28.9
6周	13.2	13.8	13.8	13.8	13.7	30.2	30.3	34.2	28.3	26.8	27.8
12周	13.4	14.0	14.3	14.7	13.8	30.2	30.3	38.0	30.6	28.4	28.5
40°C/75											
% RH											
2周	23.6	9.8	12.3	12.7	25.0	34.4	37.1	40.9	36.2	29.8	28.4

[0244] RH: 相对湿度。

[0245] 1) 主峰包括碱性0峰。

[0246] 与pH依赖的碱性峰的不同发展相反,与起始材料相比,酸性变体在两个pH值时均随时间增加(图3)。在pH 7.0时,在所有温度下观察到的酸性变体的相对峰面积增加是pH 6.0时的量的两倍。同样,在pH 6.0时,在2°C-8°C可检测到酸性变体的仅很小增加。

[0247] 因此可以得出结论,与pH 7.0时的配制品相比,pH 6.0时的配制品显示出电荷变体谱随时间推移的更小绝对变化,并且在储存期间提供了更一致的产物质量。

[0248] 表8. 配制品pH值对CZE酸性峰的影响。A-K列中的值表示CZE图中酸性变体的%AUC的总和。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T=0)	39.8	39.1	38.5	38.9	37.6	37.4	37.7	37.2	36.6	36.8	37.0
5°C/环境											
RH											
2周	42.6	41.0	41.3	41.8	41.7	38.0	38.2	38.5	38.1	37.6	37.0
6周	43.7	42.7	42.4	43.2	42.3	37.5	37.9	37.4	37.8	38.2	37.7
12周	43.7	41.1	42.9	43.8	42.8	37.4	37.0	36.0	37.5	37.8	37.1
[0249] 6个月	47.8	48.3	47.4	47.6	46.8	40.5	40.5	38.5	40.7	39.8	38.9
9个月	49.1	51.2	50.0	49.9	48.2	43.1	43.3	40.8	42.0	41.0	39.4
25°C/60%											
RH											
2周	50.5	49.9	50.5	51.2	49.6	38.3	38.6	38.0	38.7	39.8	39.0
6周	62.0	62.3	62.2	61.6	60.9	45.1	44.6	41.3	45.9	48.3	47.8
12周	71.7	71.5	71.3	70.7	69.7	51.6	51.3	45.1	49.6	54.6	54.5
40°C/75%											
RH											
2周	54.4	77.1	77.2	77.1	54.7	48.2	49.1	44.8	47.8	56.5	57.6

[0250] RH: 相对湿度。

[0251] 1) 主峰包括碱性0峰。

[0252] 在针对配制品K的单独实验中,通过CZE(使用与其他配制品相同的方法)在不同时间点测量了电荷异质性(表9)。

[0253] 表9. 配制品pH值对配制品K的CZE主峰、碱性峰和酸性峰的影响。

	主要变体[%]	碱性变体的总和[%]	酸性变体的总和[%]
初始分析 (T = 0)	39.5	24.8	35.7
5°C/环境 RH			
1.5 个月	37.1	25.7	37.1
3 个月	37.0	25.9	37.1
6 个月	34.7	25.7	39.6
9 个月	33.3	25.8	40.9
12 个月	33.5	25.4	41.1
15 个月	30.9	25.6	43.5
[0254] 18 个月	29.7	25.3	45.1
24 个月	27.1	24.8	48.1
25°C/60% RH			
1.5 个月	21.7	30.4	47.9
3 个月	15.3	27.8	56.9
6 个月	10.6	23.4	66.1
30°C/75% RH			
1.5 个月	15.3	28.4	56.3
3 个月	10.2	24.1	65.7
6 个月	8.1	18.4	73.5

[0255] RH: 相对湿度。

[0256] 1.3通过尺寸排阻色谱 (SEC) 测量的纯度

[0257] 在所有测试条件下,对于pH 6.0时的配制品,聚集水平为1.5%-2%,对于pH 7.0时的10mg/mL配制品,聚集水平为2%-2.5% (图4,表10-12)。没有观察到聚集水平的相关变化。片段的存在量为约0.1%。单体峰为>96%,并且随储存时间推移也变化很小。pH 7.0时的50mg/mL配制品随储存时间推移表现出明显更高的聚集水平,其中在压力条件下高达约4%。

[0258] 表10. 通过SEC测量的筛选的配制品A-K的纯度。该值表示对应于抗体的单体形式的%AUC。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T=0)	97.8	97.4	97.3	97.1	98.1	98.4	98.4	98.3	98.3	98.0	98.1
5°C/环境											
RH											
2周	97.9	97.8	97.7	97.0	98.3	98.4	98.4	98.3	98.4	98.1	98.3
6周	98.0	97.8	97.7	96.8	98.3	98.3	98.4	98.3	98.4	98.2	98.3
12周	97.9	97.7	97.7	96.8	98.4	98.5	98.5	98.3	98.5	98.2	98.3
6个月	97.8	97.7	97.6	96.6	98.3	98.4	98.5	98.3	98.4	98.1	98.3
9个月	97.9	97.8	97.7	96.7	98.3	98.4	98.4	98.2	98.3	98.0	98.2
25°C/60											
% RH											
2周	97.9	97.7	97.8	96.8	98.4	98.5	98.4	98.3	98.6	98.2	98.3
6周	98.0	97.9	97.7	96.4	98.3	98.4	98.5	98.2	98.4	98.0	98.2
12周	97.9	97.6	97.6	96.4	98.4	98.4	98.4	98.2	98.3	98.1	98.2
40°C/75											
% RH											
2周	97.8	97.6	97.7	96.1	98.4	98.5	98.4	98.2	98.5	98.1	98.2

[0259] RH: 相对湿度。

[0261] 表11. 通过SEC测量的筛选的配制品A-K的纯度。该值表示抗体聚集体形式的%AUC的总和。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T=0)	2.1	2.5	2.5	2.7	1.8	1.6	1.6	1.6	1.6	1.9	1.9
5°C/环境											
RH											
2周	2.0	2.2	2.2	2.8	1.7	1.6	1.6	1.6	1.5	1.8	1.7
6周	2.0	2.1	2.2	3.1	1.6	1.6	1.5	1.6	1.5	1.7	1.7
12周	2.0	2.3	2.2	3.1	1.6	1.5	1.5	1.6	1.5	1.8	1.6
6个月	2.1	2.2	2.3	3.4	1.6	1.6	1.5	1.7	1.5	1.9	1.7
9个月	2.0	2.1	2.2	3.2	1.6	1.6	1.6	1.8	1.5	1.9	1.7
25°C/60											
% RH											
2周	2.0	2.1	2.1	3.1	1.5	1.5	1.5	1.6	1.4	1.7	1.6
6周	1.9	2.0	2.2	3.5	1.5	1.5	1.5	1.7	1.4	1.9	1.8
12周	1.9	2.2	2.2	3.5	1.5	1.5	1.5	1.8	1.5	1.8	1.7
40°C/75											
% RH											
2周	1.9	2.2	2.1	3.6	1.2	1.4	1.5	1.7	1.4	1.8	1.6

[0262] RH: 相对湿度。

[0264] 表12. 通过SEC测量的筛选的配制品A-K的纯度。该值表示抗体片段的%AUC的总和。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
初始分析 (T=0)	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
5°C/环境 RH											
2周	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
6周	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.1	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
12周	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
6个月	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
9个月	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
25°C/60% RH											
2周	0.11	0.11	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
6周	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.11	<0.10	<0.10
12周	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	0.12	<0.10	<0.10	<0.10	0.15	<0.10	<0.10
40°C/75% RH											
2周	0.16	0.13	<0.10	0.18	0.21	<0.10	0.13	<0.10	0.10	<0.10	<0.10

[0266] RH: 相对湿度。

[0267] 在针对配制品K的单独实验中,通过SEC (使用与其他配制品相同的方法) 在不同时间点测量了纯度(表13)。

[0268] 表13. 通过SEC测量的配制品K的纯度。

	纯度 (单体) [%]	聚集体的总和[%]	片段的总和[%]
初始分析 (T=0)	98.9	0.54	<0.10
5°C/环境 RH			
1.5个月	98.9	0.55	<0.10
3个月	98.8	0.60	<0.10
6个月	99.0	0.62	<0.10
9个月	98.8	0.71	<0.10
12个月	98.7	0.75	<0.10
15个月	98.7	0.75	<0.10
18个月	98.8	0.78	<0.10
24个月	98.7	0.82	<0.10
25°C/60% RH			
1.5个月	98.8	0.68	<0.10
3个月	98.8	0.75	<0.10
6个月	98.9	0.78	<0.10
30°C/75% RH			
1.5个月	98.8	0.71	0.10
3个月	98.8	0.79	<0.10
6个月	98.7	0.85	0.10

[0271] RH: 相对湿度。

[0272] 实例2: 用于测量SEG101生物活性的测定

[0273] 2.1ELISA

[0274] 在ELISA中,根据SEG101样品与重组人P-选择蛋白结合的能力来测量其效力和身份。用重组人P-选择蛋白包被ELISA板,并添加分级量的SEG101。使用偶联至辣根过氧化物酶的抗人IgG抗体定量结合的SEG101,然后添加比色底物。比色反应的结果通过光吸收来测量。通过比较SEG101测试样品及SEG101参考标准品与P-选择蛋白的结合能力,量化SEG101测试样品的效力。样品和标准品根据蛋白质含量归一化。相对效力是根据欧洲药典使用平行线测定法计算。最终结果表示为样品与参考标准品相比的相对效力(以百分比)。

[0275] 2.2基于细胞的测定-表达P-选择蛋白的Raji细胞与PSGL-1的粘附的抑制

[0276] 用重组人PSGL-1包被V型底微量滴定板,然后添加分级量的SEG101。经重组修饰以在其表面上呈递人P-选择蛋白的Raji细胞可进行荧光标记并添加到板中。孵育后,将板离心,并且没有粘附的细胞积聚在V形孔的底部,在此处使用荧光读取器进行测量。通过比较SEG101测试样品及SEG101参考标准品抑制表达P-选择蛋白的Raji细胞与PSGL-1粘附的能力,量化SEG101测试样品的效力。样品和标准品根据蛋白质含量归一化。相对效力是根据欧洲药典使用平行线测定法计算。最终结果表示为样品与参考标准品相比的相对效力(以百分比)。

[0277] 表14. 立赞利珠单抗的不同电荷变体的生物活性。

	包含变体的峰	P-选择蛋白结合亲和力[%]	基于细胞的生物活性测定[%]
	D-琥珀酰亚胺-立赞利珠单抗	78	45
[0278]	异 D-琥珀酰亚胺-立赞利珠单抗	63	33
	立赞利珠单抗	90	102
	杂-异立赞利珠单抗	105	125
	同-异立赞利珠单抗	119	141

[0279] 实例3:通过尺寸排阻色谱(SEC)测量的纯度

[0280] 该测试基于具有UV检测的尺寸排阻色谱(SEC)。在天然条件下,通过SEC在合适的柱上分离不同大小的变体(例如,较低和较高分子量变体和杂质)。确定主峰的纯度以及聚集体和片段的数量,以每个色谱图中针对样品获得的总面积的百分比表示。

[0281] 所用的HPLC系统是合适的高效液相色谱系统,其配有泵、注射系统和在线脱气机、带有冷却装置的自动进样器、柱加热和能够检测210nm处的吸光度的UV检测器。柱为TSKgel G3000SWXL, 5 μ m; 7.8mm \times 300mm,或等效物。

[0282] 用流动相(150mM磷酸钾溶液, pH 6.5 \pm 0.1)稀释样品溶液至最终浓度为约0.75mg SEG101/mL。为了制备参考溶液,参考物质用流动相稀释至约0.75mg SEG101/mL的最终浓度。流动相用作空白。LOQ溶液通过用抑肽酶溶液稀释参考物质至终浓度为约0.75 μ g SEG101/mL, 2mg抑肽酶/mL制成。

[0283] 将色谱条件调整为流速0.4mL/min, UV 210nm检测, 柱温30 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C, 自动进样器温度约5 $^{\circ}$ C, 运行时间35分钟和注射量10 μ L测试溶液和参考溶液, 相当于参考溶液中约7.5 μ g SEG101。在空白色谱图中, 在测试溶液的色谱图的积分范围内, 在空白中不应检测到信号高度 \geq LOQ信号高度的干扰峰。定量限(LOQ)应使SEG101峰的信噪比 \geq 10。峰面积的重现性应使 $PA_{\text{样品}}/PA_{\text{参考}}$ 至少为0.80, 并且最大为1.20。 $PA_{\text{样品}}$ 是指每个单独样品注射的总峰面积, 单位为mAU \times min。 $PA_{\text{参考}}$ 是指样品阻断之前参考注射的总峰面积, 单位mAU \times min。

[0284] 报告了纯度(主峰的%P),在相对保留时间为0.95时没有峰情况下的聚集体(比主要组分更早洗脱)的总和(%)和片段的总和(%) (比主要组分更晚洗脱)进行。相对保留时间为0.95时的峰(保留时间相对于单体/主峰的保留时间)应单独报告。

[0285] 实例4:通过CZE测量的身份和电荷异质性

[0286] 毛细管区带电泳(CZE)的分离原理基于在电场中具有不同净电荷质量比的蛋白质的不同电泳迁移率。在低于其pI的pH值下,每种蛋白质都带正电,并且会从阳极迁移到阴极。蛋白质变体与主峰相比的迁移速度随着蛋白质变体的净电荷质量比的增加而更高。为了清楚起见,术语“主峰”是指立赞利珠单抗,即使在某些条件下药物组合物中的主要形式是异立赞利珠单抗形式。尽管出于各种原因可能导致不同的迁移率,但迁移速度快于主要变体的变体通常称为“碱性变体”,而迁移较慢的变体则称为“酸性变体”。通过UV吸收检测后,电荷变体通过相对时间校正的峰面积测定来定量。

[0287] 通过观察共混物中的主峰型或通过比较电泳图来确定身份。

[0288] 可以使用带有能够在214nm处进行检测的UV检测器的毛细管电泳系统。毛细管是未包被的熔融石英毛细管,内径为50 μ m。

[0289] 用样品缓冲液(5mM磷酸盐pH 7.3 \pm 0.1)稀释样品溶液至最终浓度为约3.0mg SEG101/mL。参考物质用样品缓冲液稀释至约3.0mg SEG101/mL的最终浓度。通过用样品缓冲液将参考物质稀释至约60 μ g SEG101/mL的最终浓度来制备敏感性溶液。通过将测试溶液与参考溶液以3:2(v/v)的比例混合来制备共混溶液。样品缓冲液用作空白。

[0290] 调节电泳条件,以使从入口到检测器的毛细管长度为40cm,毛细管的总毛细管长度为50cm,电压为20kV,极性为正,毛细管温度为25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,自动进样器温度为15 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C,运行时间为45分钟,数据速率为8Hz,在214nm处检测,并且孔径为100 \times 800 μ m,并且注射时间为0.5psi,持续8s(4psi \times s)。

[0291] 在样品的电泳图谱的积分范围内,在空白中不应检测到信号高度 \geq LOQ信号高度的干扰峰。分辨率应为 $R_s \geq 1.4$,其中分辨率 R_s 是针对参考溶液的第一次和最后一次注射计算,以评估毛细管性能。为了确定定量限(0.60%),LOQ溶液(2.0%稀释)中SEG101主峰的信噪比(S/N)必须 ≥ 10 。峰面积的重现性应使 $PA_{\text{样品}}/PA_{\text{参考}}$ 至少为0.80,并且最大为1.20。 $PA_{\text{样品}}$ 是指针对测试溶液的每次单独注射的总时间校正峰面积(mAU), $PA_{\text{参考}}$ 是指针对参考溶液的第一次注射的总时间校正峰面积(mAU)。

[0292] 对于纯度,针对每个样品记录酸性变体的相对时间校正峰面积(相对于主峰的迁移时间 >1.0)、碱性变体的相对时间校正峰面积(相对于主峰的迁移时间 <1.0)和主峰。电荷变体 $<0.60\%$ (LOQ)不包括在酸性或碱性变体总和的计算中。

[0293] 对于身份,需要在共混溶液中观察到主峰的单峰。另外,将样品溶液的峰型与参考的峰型进行比较。

[0294] 实例5:SEG101冻干配制品的制备

[0295] 表2显示了针对SEG101测试其适合性的液体配制品。

[0296] SEG101还配制成6种不同的冻干配制品,涵盖一系列不同的蛋白质浓度,冻干保护剂与蛋白质的摩尔比以及无定形冻干保护剂(蔗糖)的单独使用或与结晶填充剂(甘露醇)组合使用。表15中列出了配制品的确切组成。

[0297] 表15.SEG101冻干前配制品的组成。

	配制品	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6
	SEG101 [mg/ml]	30	40	50	30	30	30
[0298]	柠檬酸钠缓冲液 [mM]	20	20	20	20	20	20
	pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
	蔗糖 [mg/mL]	90	90	40	20	40	40
	甘露醇 [mg/mL]	0	0	0	40	80	60
[0299]	聚山梨醇酯 80 [%]	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
	摩尔比 (蔗糖 : SEG101)	1245	933	332	277	553	553

[0300] 5.1冻干过程条件

[0301] 由于配制品组成的不同,即无定形相比于部分结晶的配制品(表15),进行了两种不同的冻干过程。

[0302] 对于无定形配制品DP1、DP2和DP3选择了表16中概述的第一运行。在表17中总结的第二运行中,将包含蔗糖和甘露醇的组的配制品(即DP4、DP5和DP6)冻干。在PD阶段期间,两个运行的腔室压力均设置为0.133mbar。两个运行的二次干燥阶段(SD)相同。由于候选配制品中的总干物质含量相对较高(无定形配制品中高达443mg,部分结晶配制品中高达557mg),因此存在残留水分含量增加的风险。因此,SD期间的腔室压力降至0.05mbar,并且设定的存储温度为30℃持续8h。

[0303] 表16. 第一运行参数。

	步骤	时间 [hh:mm]	总时间	温度 [°C]	速度 [°C/min]	设定的压力
	1 加载	00:00	0	20	0.0	1000.00
	2 预冷	00:15	15	5	-1.0	1000.00
	3 预冷	01:00	75	5	0.0	1000.00
	4 冷冻	01:30	165	-40	-0.5	1000.00
[0304]	5 冷冻	03:00	330	-40	0.0	1000.00
	6 初级干燥	00:50	396	-15	0.5	0.133
	7 初级干燥	40:00	2796	-15	0.0	0.133
	8 二次干燥	01:30	2887	30	0.5	0.050
	9 二次干燥	08:00	3367	30	0.0	0.050
	总时间[h]:		56			

[0305] 表17. 第二运行参数。

步骤	时间 [hh:mm]	总时间 [min]	温度 [°C]	速度 [°C/min]	设定的压力 [mbar]	
1 加载	00:00	0	20	0.0	1000	
2 冷冻	00:15	15	5	-1.0	1000	
3 预冷	01:00	75	5	0.0	1000	
4 预冷	01:30	165	-40	-0.5	1000	
5 冷冻	03:00	345	-40	0.0	1000	
[0306] 6 退火	00:40	385	-20	0.5	1000	
7 退火	02:00	505	-20	0.0	1000	
8 冷冻	00:40	545	-40	-0.5	1000	
9 冷冻	02:00	665	-40	0.0	1000	
10 初级干燥	01:30	756	5	0.5	0.133	
11 初级干燥	01:00	2256	5	0.0	0.133	
12 二次干燥	00:50	2307	30	0.5	0.050	
13 二次干燥	08:00	2787	30	0.0	0.050	
总时间[h]:		46				

[0307] 5.2稳定性

[0308] 冻干稳定性研究的目的是比较六种冻干的SEG101配制品的理化稳定性(表15)。将配制品暴露于预期的(5°C±3°C)、加速的(25°C±2°C、60%±5% r.h.; r.h.:相对湿度)和压力(40°C±2°C, 75%±5% rh)储存条件下长达12个月并进行分析。

[0309] 将进入冻干过程的冻干前溶液的结果与冻干周期之后立即重构的溶液的结果进行比较,表明重构和冻干周期本身实际上对配制品的物理化学性质没有影响。

[0310] 5.3通过SEC确定聚集体,并且通过CZE确定电荷变体

[0311] 将冻干配制品在不同时间点(APW(另外纯化的水)中)重构,并通过SEC(表18)和CZE(表19)进行分析。

[0312] 表18.SEC的稳定性数据。

样品名称	通过 SEC 测量的聚集体的总和[%]	通过 SEC 测量的单体纯度[%]	通过 SEC 测量的片段的总数[%]	通过 SEC 测量的相对保留时间为 0.95 时的峰[%]
DP1_冻干前	0.72	98.46	0.44	0.38
DP2_冻干前	0.80	98.39	0.42	0.39
DP3_冻干前	0.96	98.22	0.45	0.37
DP4_冻干前	0.83	98.33	0.45	0.39
DP5_冻干前	0.65	98.53	0.44	0.39
DP6_冻干前	0.67	98.49	0.46	0.38
DP1_40C_6m	1.00	98.27	0.33	0.40
DP2_40C_6m	1.24	98.03	0.34	0.40
DP3_40C_6m	4.61	94.62	0.34	0.42
[0313] DP4_40C_6m	3.88	95.37	0.35	0.41
DP5_40C_6m	2.14	97.09	0.36	0.41
DP6_40C_6m	2.03	97.25	0.32	0.40
DP1_5C_12m	0.77	98.52	0.36	0.35
DP2_5C_12m	0.83	98.44	0.37	0.36
DP3_5C_12m	1.25	98.05	0.34	0.36
DP4_5C_12m	1.28	97.89	0.45	0.39
DP5_5C_12m	0.79	98.51	0.36	0.34
DP6_5C_12m	0.78	98.55	0.32	0.36
DP1_25C_12m	0.81	98.53	0.32	0.35
DP2_25C_12m	1.00	98.43	0.22	0.36
DP3_25C_12m	2.53	96.76	0.35	0.36
DP4_25C_12m	2.05	97.22	0.37	0.36
DP5_25C_12m	1.23	98.06	0.36	0.35
DP6_25C_12m	1.23	98.04	0.36	0.37

[0314] 表19.CZE的稳定性数据。

样品名称	CZE 主要变体 [%]	CZE 酸性峰总和 [%]	CZE 碱性峰总和 [%]	样品名称	CZE 主要变体 [%]	CZE 酸性峰总和 [%]	CZE 碱性峰总和 [%]
DP1_冻干前	41.9	34.0	24.1	DP1_5C_12m	41.0	33.4	25.6
DP2_冻干前	41.8	34.1	24.1	DP2_5C_12m	41.0	33.5	25.5
DP3_冻干前	41.5	34.7	23.8	DP3_5C_12m	41.3	33.1	25.6
[0315] DP4_冻干前	41.3	34.6	24.2	DP4_5C_12m	40.7	33.4	26.0
DP5_冻干前	41.8	34.4	23.8	DP5_5C_12m	40.9	33.2	25.9
DP6_冻干前	41.8	34.5	23.7	DP6_5C_12m	40.9	33.5	25.7
DP1_40C_6m	37.7	37.7	24.6	DP1_25C_12m	39.8	34.3	25.9
DP2_40C_6m	38.1	37.1	24.8	DP2_25C_12m	40.3	33.3	26.4
DP3_40C_6m	34.3	38.7	27.0	DP3_25C_12m	38.6	33.8	27.7
DP4_40C_6m	34.5	38.5	27.0	DP4_25C_12m	38.5	34.2	27.3
DP5_40C_6m	36.4	37.2	26.4	DP5_25C_12m	39.1	34.3	26.6
DP6_40C_6m	36.4	37.4	26.2	DP6_25C_12m	40.0	33.4	26.6

[0316] 5.4对DP2的进一步研究

[0317] 5.4.1长期稳定性测试(5℃)

[0318] DP2在5℃下储存6个月后,所有结果均在针对长期储存条件设定的要求内。对于所有测试的质量特征,未观察到趋势。

[0319] 5.4.2加速稳定性测试(25℃/60%RH)

[0320] DP2在25℃/60%RH下储存6个月后,除表20中列出的结果外,对于所有质量特征未观察到趋势。所有其他方法的结果都遵循加速条件下预期的趋势。所有结果均在针对长期储存条件设定的要求内。

[0321] 表20.如通过CZE测量,在25℃存储的在不同时间点的DP2中的电荷变体。

	主要变体 [%]	碱性变体的总和 [%]	酸性变体的总和 [%]
[0322] 初始分析 (t = 0)	39.6	24.7	36.0
1.5 个月	38.9	25.2	36.0
3 个月	39.4	26.1	34.6
6 个月	37.3	27.0	35.7

[0323] 5.4.3压力稳定性测试(40摄氏度/75%RH)

[0324] DP2在40℃/75%RH下储存6个月后,除表21中列出的结果外,对于所有质量特征未观察到趋势。

[0325] 所有其他方法的结果都遵循压力条件下预期的趋势。所有结果均在针对长期储存条件设定的要求内。

[0326] 表21.DP2压力测试期间观察到的变化。

	通过 CZE 测量的电荷异质性			通过尺寸排阻色谱 (SEC) 测量的纯度				
	主要变体 [%]	碱性变体的总和 [%]	酸性变体的总和 [%]	纯度 (单体) [%]	聚集体的总和 [%]	片段的总和 [%]	在 rRT 0.95 时的峰 [%]	
[0327]								
	初始分析 (t = 0)	39.6	24.7	36.0	98.7	0.91	< 0.10	0.35
	1.5 个月	37.6	25.9	36.6	98.5	1.1	< 0.10	0.37
	3 个月	37.7	26.7	35.6	98.4	1.2	< 0.10	0.36
	6 个月	36.0	27.8	36.1	98.3	1.3	< 0.10	0.36

[0328] rRT: 相对保留时间。

[0329] 5.5 其他分析方法的结果

[0330] 所有重构的配制品实际上在所有拉下点处都没有可见的颗粒并且无色。在所有压力条件下, UV 含量和 pH 均保持不变 (在方法变异性或预期的小瓶之间变异性内)。用 ELISA 和基于细胞的测定确定的配制品 DP1、DP2 和 DP3 的生物活性在 40°C 下 6 个月后没有变化 (在预期的方法变异性内), 并且在 5°C 和 25°C 下 12 个月后 DP1 和 DP2 的生物学活性没有变化 (表 22)。

[0331] 表 22. 针对 ELISA 和生物测定的冻干稳定性数据。

	样品名称	ELISA - 相对效力	基于细胞的测定 - 相对效力
		[%]	[%]
[0332]	DP1_40C_3m	94	85
	DP2_40C_3m	88	89
	DP3_40C_3m	90	101
	DP1_40C_6m	91	97
	DP2_40C_6m	91	97
	DP3_40C_6m	92	100
	DP1_5C_12m	91	101
	DP2_5C_12m	100	99
	DP1_25C_12m	85	102
	DP2_25C_12m	96	100

[0333] 实例 6: 使用表面等离子体共振分析 (SPR) 在人样品 (PD) 中测量立赞利珠单抗及其任何变体对 P-选择蛋白的抑制

[0334] 使用基于 SPR 的方法以测量来自使用立赞利珠单抗治疗的人供体的人血清样品中立赞利珠单抗的离体 P-选择蛋白抑制%。该 PD 测定法测量了血清中立赞利珠单抗及其变体阻断 P-选择蛋白 (抗原; 配体) 与 PSGL-1 (配体受体) 结合的能力。立赞利珠单抗及其任何变

体的阻断作用是以与免疫球蛋白融合的加标P-选择蛋白 (Psel-Ig) 与糖硫肽6 (GSP-6) (其是模拟PSGL-1结合结构域的肽类似物) 结合的抑制%来衡量。例如,将链霉亲和素通过标准胺偶联固定在所用生物传感器芯片的2个通道 (FC-2和FC-3) 上,然后注射生物素化的GSP-6以固定肽进行分析。通过阻断生物素的链霉亲和素制备了参考通道 (FC-1)。对于每个受试者,预处理样品建立了最大结合,这被用作在不同时间点使用来自受试者的给药后血清样品计算%抑制的基础。使用以一系列稀释的定量立赞利珠单抗及其任何变体来生成标准抑制曲线,其显示在所有条件下立赞利珠单抗的 IC_{50} 值为 $5.2\mu\text{g/mL}$ 。

[0335] 来自SCD患者的血清样品与不含Psel-Ig和含有Psel-Ig的阻断缓冲液 (分别作为阴性对照和阳性对照样品) 混合。

[0336] 该测定表明从患者收集的血清中的立赞利珠单抗及其任何变体确实结合至靶。患者血清中的立赞利珠单抗及其任何变体阻断98%的加标P-选择蛋白 (Psel-Ig) 与糖硫肽6 (GSP-6) 的结合。

序列表

<110> 诺华股份有限公司 (Novartis AG)

<120> 抗体配制品

<130> PAT058708-WO-PCT

<160> 10

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链CDR1

[0001] <400> 1

Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链CDR2

<400> 2

Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重链CDR3

<400> 3

Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0002] <220>
 <223> 轻链CDR1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly His Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链CDR2

<400> 5

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Asp Glu Asn Pro Leu Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0003]

<220>
 <223> 重链可变区 (VH)

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

[0004] <213> 人工序列

<220>

<223> 轻链可变区 (VL)

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp
 85 90 95

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重链

[0005]

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Glu Tyr Gly Asn Tyr Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

[0006] Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys
210 215 220

Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Ala Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

[0007]

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 10
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 轻链

<400> 10

[0008] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30

Gly His Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp
 85 90 95

Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

[0009]

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

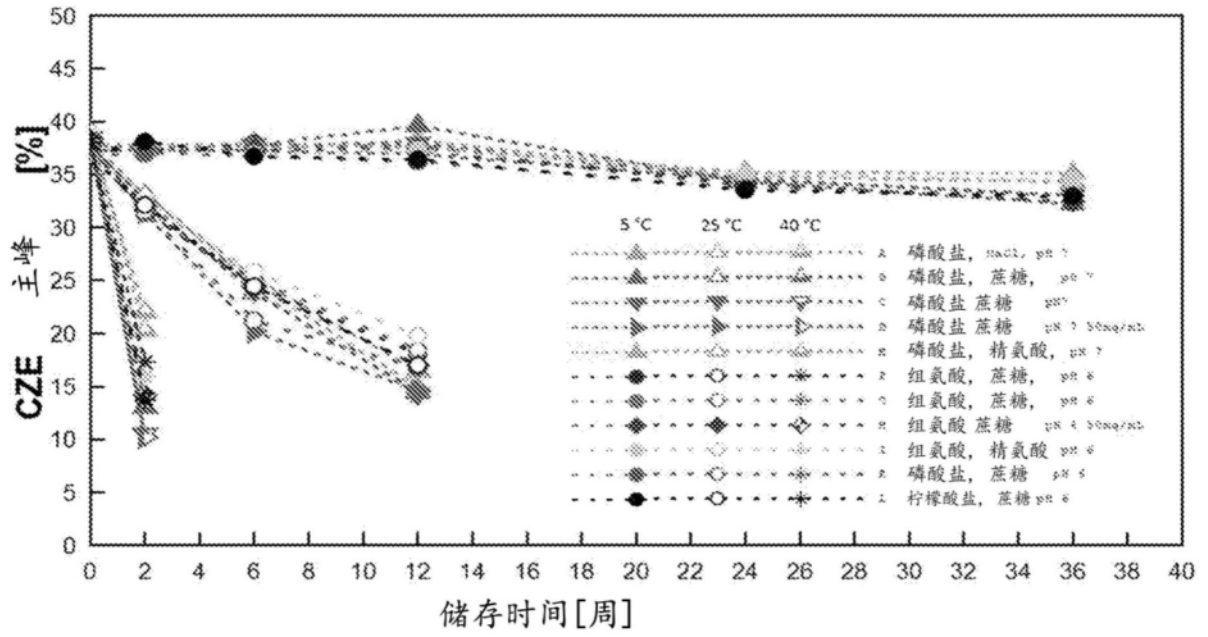
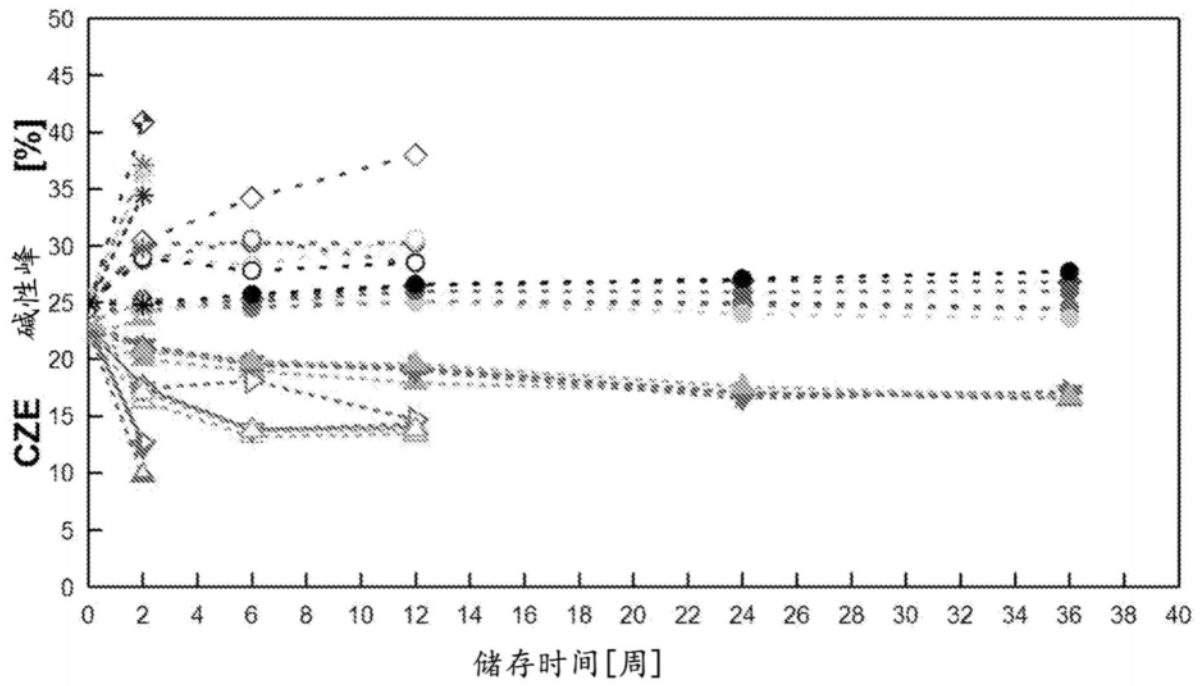


图1



5 °C	25 °C	40 °C		
▲	△	△	A	磷酸盐, NaCl, pH 7
▲	△	△	B	磷酸盐, 蔗糖, pH 7
▼	▽	▽	C	磷酸盐 蔗糖 pH7
▶	▶	▶	D	磷酸盐 蔗糖 pH 7 50mg/mL
▲	△	△	E	磷酸盐, 精氨酸, pH 7
●	○	*	F	组氨酸, 蔗糖, pH 6
●	○	*	G	组氨酸, 蔗糖, pH 6
◆	◆	◆	H	组氨酸 蔗糖 pH 6 50mg/mL
◆	○	*	I	组氨酸, 精氨酸 pH 6
●	○	*	K	磷酸盐, 蔗糖 pH 6
●	○	*	L	柠檬酸盐, 蔗糖 pH 6

图2

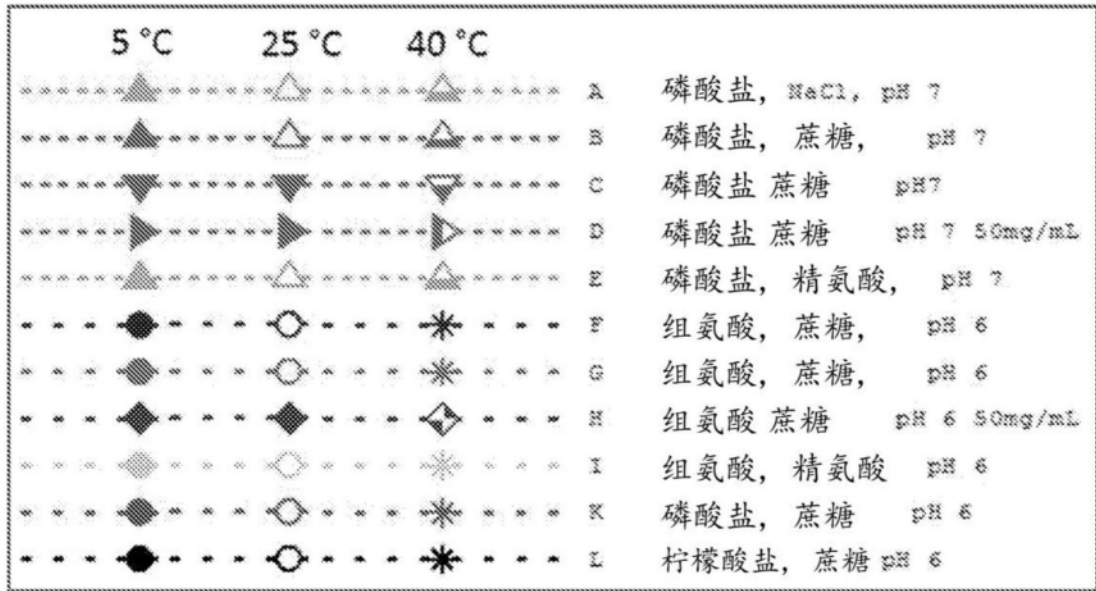
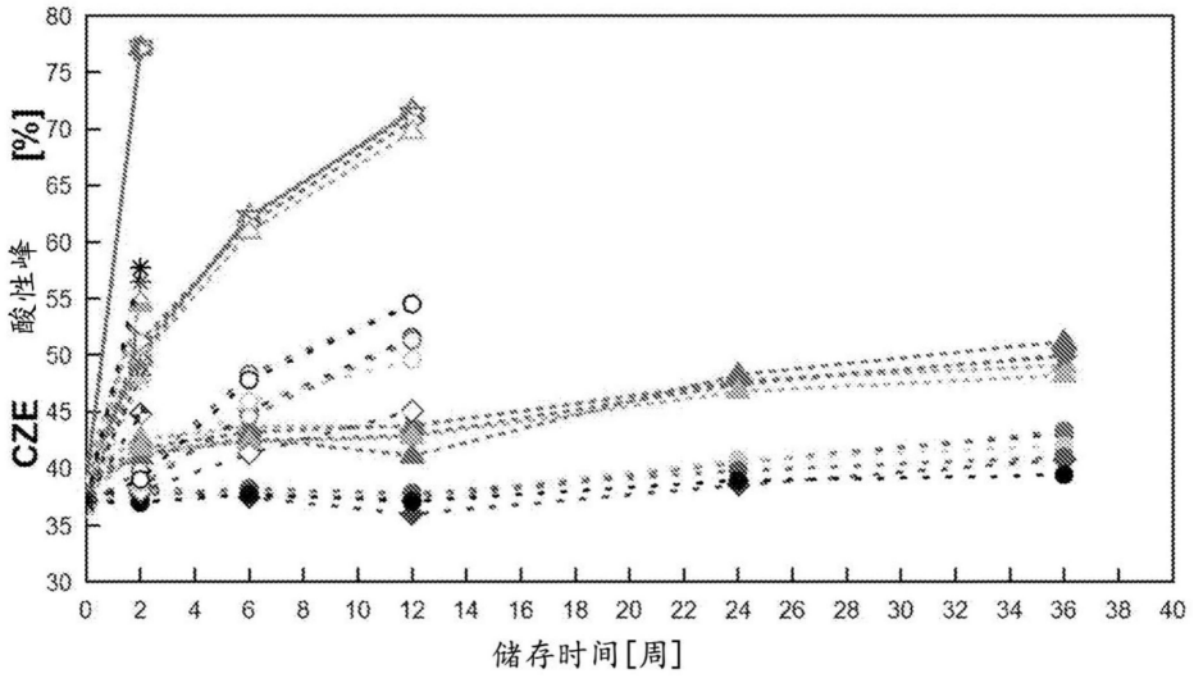
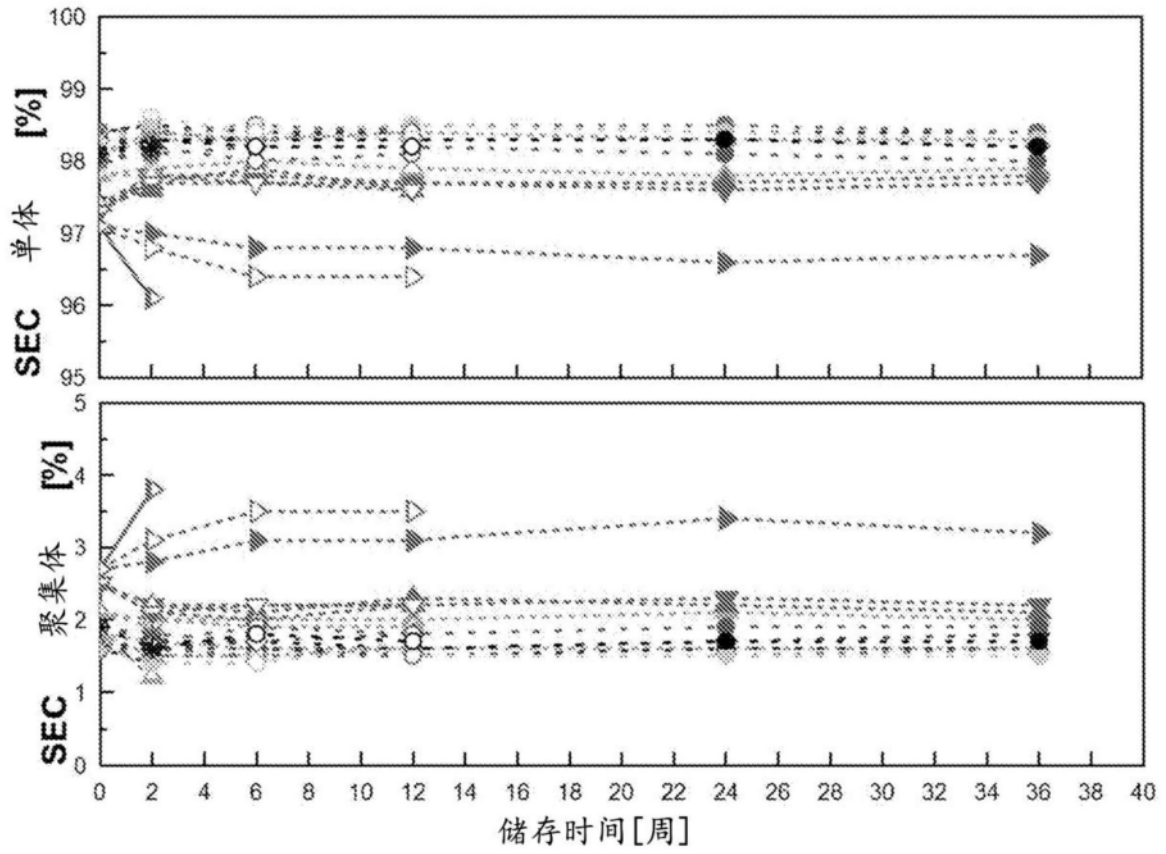


图3



	5 °C	25 °C	40 °C		
-----▲-----	△	△	△	A	磷酸盐, NaCl, pH 7
-----▲-----	△	△	△	B	磷酸盐, 蔗糖, pH 7
-----▼-----	▽	▽	▽	C	磷酸盐 蔗糖 pH7
-----▶-----	▷	▷	▷	D	磷酸盐 蔗糖 pH 7 50mg/mL
-----▲-----	△	△	△	E	磷酸盐, 精氨酸, pH 7
-----●-----	○	*	*	F	组氨酸, 蔗糖, pH 6
-----◆-----	◇	*	*	G	组氨酸, 蔗糖, pH 6
-----◆-----	◇	◇	◇	H	组氨酸 蔗糖 pH 6 50mg/mL
-----●-----	○	*	*	I	组氨酸, 精氨酸 pH 6
-----●-----	○	*	*	J	磷酸盐, 蔗糖 pH 6
-----●-----	○	*	*	K	柠檬酸盐, 蔗糖 pH 6

图4

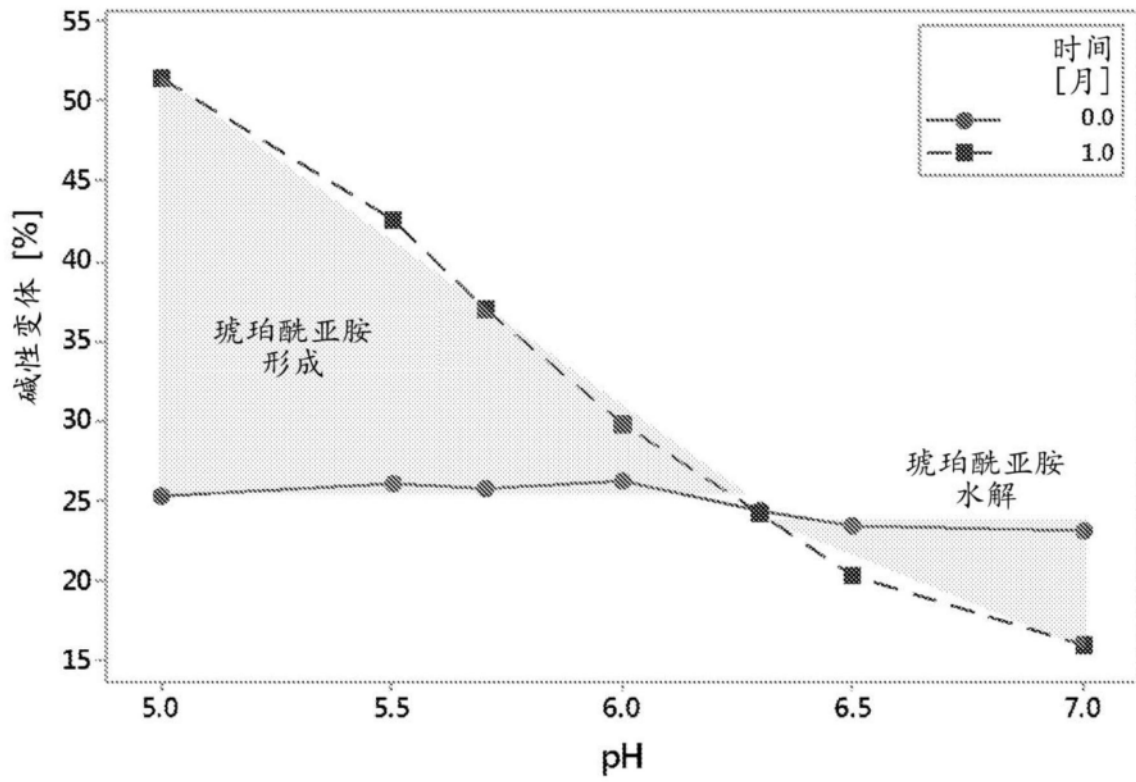


图5