



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104740632 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201510111453. 6

(22) 申请日 2008. 11. 28

(30) 优先权数据

61/004992 2007. 11. 30 US

(62) 分案原申请数据

200880125402. 7 2008. 11. 28

(71) 申请人 ABBVIE 公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 W. 福仑贺夫 A. 巴特 H-J. 克洛司

M. 泰斯寇普 K. 卡乐塔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 徐厚才

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 9/08(2006. 01)

A61K 47/10(2006. 01)

A61K 47/26(2006. 01)

A61K 47/34(2006. 01)

权利要求书1页 说明书139页 附图36页

(54) 发明名称

蛋白制剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及蛋白制剂及其制备方法。本发明提供了一种包含水和蛋白的水制剂及其制备方法。本发明的水制剂可以是高蛋白制剂和/或可以具有由低水平的离子型赋形剂产生的低水平的电导率。本发明也包括具有低重量摩尔渗透压浓度的包含水和蛋白的制剂。

1. 一种基本上由阿达木单抗和水组成的水药物制剂。
2. 权利要求 1 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 4-8。
3. 权利要求 1 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 5-7。
4. 一种包含阿达木单抗和水的水药物制剂,其中所述制剂不包含张力调节剂。
5. 权利要求 4 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 4-8。
6. 权利要求 4 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 5-7。
7. 一种包含阿达木单抗和水的水药物制剂,其中所述制剂基本上是没有缓冲剂的。
8. 权利要求 7 的制剂,其中所述制剂另外包含非可离子化赋形剂。
9. 权利要求 7 的制剂,其中所述制剂另外包含多元醇。
10. 权利要求 9 的制剂,其中所述多元醇选自甘露醇、山梨醇和蔗糖。
11. 权利要求 7 的制剂,其中所述制剂另外包含表面活性剂。
12. 权利要求 11 的制剂,其中所述表面活性剂选自聚山梨醇酯 80 和聚山梨醇酯 20。
13. 权利要求 7 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 4-8。
14. 权利要求 7 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 5-7。
15. 一种包含阿达木单抗和水的水药物制剂,其中所述制剂不包含缓冲系统。
16. 权利要求 15 的制剂,其中所述制剂另外包含非可离子化赋形剂。
17. 权利要求 15 的制剂,其中所述制剂另外包含多元醇。
18. 权利要求 17 的制剂,其中所述多元醇选自甘露醇、山梨醇和蔗糖。
19. 权利要求 15 的制剂,其中所述制剂另外包含表面活性剂。
20. 权利要求 19 的制剂,其中所述表面活性剂选自聚山梨醇酯 80 和聚山梨醇酯 20。
21. 权利要求 15 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 4-8。
22. 权利要求 15 的制剂,其中所述制剂的 pH 为 5-7。

## 蛋白制剂及其制备方法

[0001] 本申请是国际申请日为 2008 年 11 月 28 日的国际申请 PCT/US2008/085066 进入中国、申请号为 200880125402.7 的题为“蛋白制剂及其制备方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求 2007 年 11 月 30 日提交的美国临时申请号 61/004992 的优先权利益，该优先权申请的内容通过援引并入本文。

[0004] 技术领域和背景技术

[0005] 药用蛋白制剂的一个基本原理是，必须克服某些不稳定性。蛋白的降解途径可以分成 2 个不同类别，包含化学不稳定性和物理不稳定性。化学不稳定性导致蛋白的修饰，这通过键形成或切割来实现。化学不稳定性问题的实例包括脱酰胺化、外消旋化、水解、氧化、 $\beta$  消除和二硫化物交换。另一方面，物理不稳定性不会导致蛋白的共价变化。相反，它们包含蛋白的更高级结构（二级和以上）的变化。这些包括变性、向表面吸附、聚集和沉淀 (Manning 等人, Pharm. Res. 6, 903(1989))。

[0006] 广泛接受的是，通过在制剂中包含其它分子，可以克服这些对药用蛋白制剂的商业生存力和功效具有巨大影响的不稳定性。通过在溶液中包含与蛋白相互作用的赋形剂来保持蛋白稳定、可溶和不聚集，可以提高蛋白稳定性。例如，盐化合物和其它离子物质是蛋白制剂的非常常见的添加剂。通过以非特异性方式结合蛋白和增加热稳定性，它们辅助对抗蛋白的变性。盐化合物（例如，NaCl, KCl）已经成功地用于商业胰岛素制品来对抗聚集和沉淀（上文，在 911）。已经证实，当用作制剂添加剂时，氨基酸（例如，组氨酸，精氨酸）会减少蛋白二级结构的改变 (Tian 等人, Int' l J. Pharm. 355, 20(2007))。常用的添加剂的其它实例包括多元醇材料（例如甘油和糖）和表面活性剂例如去污剂，可以是非离子型（例如，吐温 (Tween)，普卢兰尼克 (Pluronic)) 和阴离子型（十二烷基硫酸钠）。添加剂在所有液体商业蛋白制剂中的几乎普遍的流行，暗示着没有这样的化合物的蛋白溶液可能遇到由不稳定性导致的降解挑战。

[0007] 蛋白制剂的基本目标是，维持特定蛋白以它的天然的、药学活性的形式稳定延长的时间段，以确保药用蛋白药物的可接受的贮存期限。但是，维持蛋白在溶液中的稳定性和溶解度，是在治疗剂中包含添加剂的药物制剂的巨大挑战。迄今为止，生物制剂需要其它赋形剂来维持蛋白稳定性。通常，液体药物制剂含有多种稳定性添加剂。例如，用于患者自己施用人生长激素 Norditropin **SimpleXx**<sup>®</sup> 的液体制剂含有添加剂甘露醇（一种糖醇）、组氨酸和泊洛沙姆 188（一种表面活性剂）来稳定激素。

[0008] 药物添加剂需要是可溶的、无毒的，并以对特定治疗性蛋白提供稳定作用的特定浓度来使用。由于添加剂的稳定作用是蛋白 - 和浓度 - 依赖性的，必须小心地测试考虑用于药物制剂的每种添加剂，以确保它不会造成不稳定性或对制剂的化学或物理构成 (make-up) 产生其它负面作用。用于稳定化蛋白的成分可能造成储存期间蛋白随着时间的稳定性或蛋白随着环境变化的稳定性的问题。

[0009] 通常，如下实现长贮存期限：通过以冷冻形式（例如，在  $-80^{\circ}\text{C}$ ）储存蛋白，或通过

对蛋白进行低压冻干过程,即通过以低压冻干形式储存蛋白,在即将使用前需要重配步骤,和从而在患者方便性方面产生显著不利。但是,为了储存而冷冻蛋白制剂可能导致局部高浓度的蛋白和添加剂,这会在制剂内产生局部极端的 pH、降解和蛋白聚集。另外,本领域技术人员熟知,冷冻和融化过程经常影响蛋白稳定性,这意味着即使以冷冻形式储存药物蛋白也会伴有由冷冻和融化步骤导致的稳定性丧失。另外,低压冻干的第一个工艺步骤包含冷冻,这可能不利地影响蛋白稳定性。在工业场合,在药品生产(保持(holding)步骤,储存,再冷冻和再融化来增加药物产品填充-完工的时限和批次大小弹性)和随后的药物产品填充-完工(低压冻干)的过程中,可能对药物蛋白进行重复的冷冻-融化处理。众所周知,遇到蛋白不稳定性现象的风险随着药物蛋白遇到的冷冻-融化循环数目的增加而增加,达到在重复的冷冻-融化过程中维持蛋白稳定性的制剂条件是一项挑战性的任务。在生物药物工业中存在下述需要,即可以不产生不希望的制剂性质、特别是 pH 梯度、渗透性、密度或蛋白或赋形剂浓度地冷冻和融化的制剂。

[0010] 基于蛋白的药物产品经常需要为了治疗功效而配制成高浓度。高度浓缩的蛋白制剂希望用于治疗用途,因为它们能实现更小体积的剂量,限制患者不适,且其包装和储存更经济。但是,高蛋白浓度制剂的开发存在许多挑战,包括生产挑战、稳定性挑战、分析挑战、和尤其对于治疗蛋白而言的递送挑战。例如,蛋白的聚集、不溶性和降解的困难,通常随着制剂中蛋白浓度的升高而增加(评论参见 Shire, S. J. 等人. *J. Pharm. Sci.*, 93, 1390 (2004))。添加剂可能造成以前没有观察到的不利作用,其在更低的添加剂或蛋白浓度,提供有益作用。高浓度蛋白制剂的生产可能导致乳色、聚集和沉淀的显著问题。除了可能发生非天然蛋白聚集和微粒形成、可逆的自联的可能性以外,可能导致增加的粘度或其它性质,使注射递送复杂化。高粘度也可能使通过过滤方法生产高蛋白浓度复杂化。

[0011] 因而,药用蛋白制剂通常小心地平衡成分和浓度来增加蛋白稳定性和治疗需求,同时限制任何不利的副作用。生物制剂应当包括稳定的蛋白(甚至在高浓度)和特定量的赋形剂,减少潜在的治疗并发症、储存问题和总成本。

[0012] 随着蛋白和其它生物大分子作为药物分子获得更多关注,用于递送这样的分子的制剂变成一个重要的问题。尽管用于治疗用途的蛋白的大规模生产取得革命性进展,这些试剂在身体中的有效且方便的递送仍然是一个重大挑战,这归因于它们固有的理化和生物性质,包括较差的跨生物膜渗透,大分子量,短血浆半衰期,自联,物理和化学不稳定性,聚集,吸附和免疫原性。

## 发明内容

[0013] 本发明指向下述令人惊奇的发现,即在水中配制的蛋白在长期液体储存或其它处理步骤(例如冷冻/融化和低压冻干)过程中会维持溶解度以及稳定性,甚至在高浓度时。

[0014] 本发明涉及包含水和蛋白的蛋白水制剂的方法和组合物,其中所述蛋白是稳定的,不需要其它试剂。具体地,本发明的方法和组合物是基于渗滤处理,其中使用水作为渗滤介质,渗滤含有目标蛋白的第一溶液。该过程的进行,使得与水存在至少确定体积的交换,例如 5 倍体积交换。通过执行本发明的方法,得到的水制剂具有与起始蛋白溶液相比显著降低的赋形剂总百分比。例如,发现水制剂与起始蛋白溶液相比减少了 95-99% 赋形剂。尽管赋形剂减少,蛋白保持可溶,且保持它的生物活性,甚至在高浓度时。在一个方面,本发

明的方法产生这样的组合物,其包含增加浓度的蛋白,同时减少其它组分,例如离子型赋形剂。这样,水制剂中蛋白的流体动力学直径比标准缓冲溶液例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的相同蛋白更小。

[0015] 本发明的制剂与标准的缓冲制剂相比具有许多优点。在一个方面,所述水制剂包含高蛋白浓度,例如 50-200mg/mL 或更多。在本发明的制剂中可以包含所有大小的蛋白,甚至在提高的浓度。尽管蛋白是高浓度,所述制剂具有极微小的聚集,且可以使用各种方法和形式来储存,例如冷冻,而没有高蛋白制剂可能预见到的有害作用。本发明的制剂不需要在常规制剂中用于稳定溶液中的蛋白的赋形剂,例如,表面活性剂和缓冲系统。作为低水平离子型赋形剂的结果,本发明的水制剂具有低电导率,例如,小于 2mS/cm。本发明的方法和组合物也会提供具有低重量摩尔渗透压浓度的蛋白水制剂,例如,不大于 30mOsmol/kg。另外,本文所述的制剂胜过标准的制剂,因为它们具有降低的免疫原性,这是由于缺少蛋白稳定化所需的其它试剂。

[0016] 本发明的方法和组合物可以用于提供包含水和任意类型的目标蛋白的水制剂。在一个方面,本发明的方法和组合物用于大蛋白,包括大于 47kDa 的蛋白。抗体和其片段,包括用于体内和体外目的的那些,是可以用于本发明的方法和组合物中的蛋白的另一个实例。

[0017] 此外,制备蛋白和肽制剂必需的多步骤纯化和浓缩过程经常在组合物中引入变异性,使得制剂的精确组成可能随批次而异。联邦规程要求药物组成在它们的制剂中高度一致,无论生产位置或批号。本发明的方法可以用于建立在水中配制的蛋白溶液,以精确量向其加回缓冲剂和赋形剂,以建立具有精确浓度的缓冲剂和 / 或赋形剂的蛋白制剂。

[0018] 在一个实施方案中,本发明提供了包含蛋白和水的水制剂,其中所述制剂具有某些特征,例如,但不限于,低电导率,例如,小于约 2.5mS/cm 的电导率,至少约 10  $\mu$ g/mL 的蛋白浓度,不超过约 30mOsmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度,和 / 或所述蛋白具有大于约 47kDa 的分子量 ( $M_w$ )。在一个实施方案中,本发明的制剂具有提高的稳定性,例如,但不限于,液体形式长时间(例如,至少约 3 个月或至少约 12 个月)的稳定性或经过至少一个冷冻 / 融化循环(如果不是更多个冷冻 / 融化循环)的稳定性。在一个实施方案中,制剂能以选自冷冻、低压冻干或喷雾干燥的形式稳定至少约 3 个月。

[0019] 在一个实施方案中,在本发明的制剂中包含的蛋白可以具有最小的大小,包括,例如,大于约 47kDa 的  $M_w$ ,大于约 57kDa 的  $M_w$ ,大于约 100kDa 的  $M_w$ ,大于约 150kDa 的  $M_w$ ,大于约 200kDa 的  $M_w$ ,或大于约 250kDa 的  $M_w$ 。

[0020] 在一个实施方案中,本发明的制剂具有低电导率,包括,例如,小于约 2.5mS/cm 的电导率,小于约 2mS/cm 的电导率,小于约 1.5mS/cm 的电导率,小于约 1mS/cm 的电导率,或小于约 0.5mS/cm 的电导率。

[0021] 在一个实施方案中,在本发明的制剂中包含的蛋白具有给定的浓度,包括,例如,至少约 1mg/mL 的浓度,至少约 10mg/mL,至少约 50mg/mL,至少约 100mg/mL,至少约 150mg/mL,至少约 200mg/mL,或大于约 200mg/mL。

[0022] 在一个实施方案中,本发明的制剂具有不超过约 15mOsmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度。

[0023] 在一个实施方案中,本发明提供了包含水和给定浓度的蛋白的水制剂,其中所述

蛋白具有这样的流体动力学直径 ( $D_h$ ), 它比给定浓度的缓冲溶液中的蛋白的  $D_h$  小至少约 50%。在一个实施方案中, 蛋白的  $D_h$  比给定浓度的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中的蛋白的  $D_h$  小至少约 50%; 蛋白的  $D_h$  比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小至少约 60%; 蛋白的  $D_h$  比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小至少约 70%。

[0024] 在一个实施方案中, 本发明提供了包含蛋白的水制剂, 所述蛋白例如, 但不限于, 抗体或抗原结合片段, 其中所述蛋白具有小于约  $5 \mu\text{m}$  的流体动力学直径 ( $D_h$ )。在一个实施方案中, 所述蛋白具有小于约  $3 \mu\text{m}$  的  $D_h$ 。

[0025] 任意蛋白可以用于本发明的方法和组合物中。在一个实施方案中, 所述制剂包含治疗蛋白。在一个实施方案中, 所述制剂包含抗体或其抗原结合片段。可以包含在本发明的方法和组合物中的抗体或抗原结合片段的类型包括、但不限于, 嵌合抗体, 人抗体, 人化抗体和结构域抗体 (dAb)。在一个实施方案中, 抗体或其抗原结合片段是抗 -TNF $\alpha$ , 例如但不限于阿达木单抗或 golimumab 或抗 -IL-12 抗体, 例如但不限于 J695。另外, 本发明的制剂也可以包含至少两种不同类型的蛋白, 例如, 阿达木单抗和 J695。

[0026] 在本发明的另一个实施方案中, 所述制剂还可以包含非可离子化赋形剂。非可离子化赋形剂的实例包括、但不限于, 糖醇或多元醇 (例如, 甘露醇或山梨醇), 非离子型表面活性剂 (例如, 聚山梨醇酯 80, 聚山梨醇酯 20, 聚山梨醇酯 40, 聚山梨醇酯 60), 和 / 或糖 (例如, 蔗糖)。可以在本发明的制剂中另外包含的非可离子化赋形剂的其它非限制性实例包括、但不限于, 非 - 海藻糖, 棉子糖, 和麦芽糖。

[0027] 在一个实施方案中, 所述制剂不包含选自下述的试剂: 张力调节剂, 稳定剂, 表面活性剂, 抗氧化剂, 冷冻保护剂, 填充剂, 冻干保护剂, 碱性组分和酸性组分。

[0028] 本发明的制剂可以适用于任意用途, 包括体外和体内用途。在一个实施方案中, 本发明的制剂适合通过下述给药模式施用给受试者, 包括, 但不限于, 皮下的, 静脉内的, 吸入的, 皮内的, 透过皮肤的, 腹膜内的, 和肌肉内的给药。本发明的制剂可以用于治疗受试者的病症。

[0029] 本发明也包含可以用于递送本发明的制剂的装置。这样的装置的实例包括、但不限于, 注射器, 笔, 植入物, 无针注射装置, 吸入装置, 和贴剂。

[0030] 在一个实施方案中, 本发明的制剂是药物制剂。

[0031] 本发明也提供了制备包含蛋白和水的水制剂的方法, 该方法包含, 提供在第一溶液中的蛋白, 使用水作为渗滤介质, 对第一溶液进行渗滤, 直到已经实现与水至少 5 倍体积交换, 从而制备水制剂。在一个实施方案中, 在得到的制剂中的蛋白保留它的生物活性。

[0032] 本发明另外提供了制备蛋白的水制剂的方法, 该方法包含, 提供在第一溶液中的蛋白, 使用水作为渗滤介质, 对第一溶液进行渗滤, 直到已经实现与水至少 5 倍体积交换, 从而制备渗滤过的蛋白溶液; 浓缩渗滤过的蛋白溶液, 从而制备蛋白的水制剂。在一个实施方案中, 在得到的制剂中的蛋白保留它的生物活性。

[0033] 在一个实施方案中, 通过离心, 浓缩渗滤过的蛋白溶液。

[0034] 在一个实施方案中, 所述渗滤介质由水组成。

[0035] 在一个实施方案中, 用水对所述第一溶液进行渗滤, 直到实现大于 5 倍体积交换的体积交换。在一个实施方案中, 用水对所述第一溶液进行渗滤, 直到实现至少约 6 倍体积交换。在一个实施方案中, 用水对所述第一溶液进行渗滤, 直到实现至少约 7 倍体积交换。

- [0036] 在一个实施方案中,所述水制剂中的赋形剂终浓度比第一溶液小至少约 95%。
- [0037] 在一个实施方案中,所述水制剂中的赋形剂终浓度比第一溶液小至少约 99%。
- [0038] 在一个实施方案中,从哺乳动物细胞表达系统得到第一蛋白溶液,且已经纯化,以去除宿主细胞蛋白 (HCPs)。
- [0039] 在一个实施方案中,本发明的方法还包含,向水制剂添加赋形剂。

#### 附图说明

[0040] 图 1 显示了阿达木单抗参照标准品 AFP04C(底线)、阿达木单抗 DS(DF/UF 处理前(中线)和处理后(顶线)的药品)的 SEC 色谱图。

[0041] 图 2 显示了向 DF/UF- 处理过的阿达木单抗单体加入赋形剂化合物后,山梨醇(非可离子化赋形剂)和 NaCl(可离子化赋形剂)浓度对阿达木单抗单体的流体动力学直径( $D_h$ )的影响。

[0042] 图 3 显示了 J695 参照标准品(下图)和 pH 调节至 pH 4.4 的 J695DS(上图)的 IEC 图谱。

[0043] 图 4 显示了 pH 4.7 的用 Milli-Q 水 DF/UF 后的 J695(上图)和 pH 调节至 pH 4.4 的 DF/UF 之前的 J695DS(下面曲线)的 IEC 图谱。

[0044] 图 5 用图形描述了流体动力学直径(z-平均值)和阿达木单抗浓度(溶于 WFI)的关系。X:使用 1.1mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定,y:使用 1.9mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定。

[0045] 图 6 用图形描述了流体动力学直径(峰单体)和阿达木单抗浓度(溶于 WFI)的关系。X:使用 1.1mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定,y:使用 1.9mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定。

[0046] 图 7 用图形描述了流体动力学直径(z-平均值)和 J695 浓度(溶于 WFI)的关系。X:使用 1.1mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定,y:使用 1.9mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定。

[0047] 图 8 用图形描述了流体动力学直径(峰单体)和 J695 浓度(溶于 WFI)的关系。X:使用 1.1mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定,y:使用 1.9mPas 作为假定的样品粘度,用 SOP 测定。

[0048] 图 9 显示了依赖于注射用水中阿达木单抗浓度的阿达木单抗的赖氨酸 0、1 和 2 的总和 [%]。

[0049] 图 10 显示了依赖于注射用水中 J695 浓度的 J695 的峰 1-7 的总和 [%]。

[0050] 图 11 显示了依赖于注射用水中 J695 浓度的 J695 的酸性峰的总和 [%]。

[0051] 图 12 显示了依赖于注射用水(WFI)中 J695 浓度的 J695 的碱性峰的总和 [%]。

[0052] 图 13 显示了在实施例 12 中进行的渗析的效率,显示出组分的减少导致的制剂的重量摩尔渗透压浓度和电导率(BDS, 74mg/ml, 10ml 样品体积, SpectraPor7MWC010k)。

[0053] 图 14 显示了渗析的阿达木单抗本体溶液的 pH 水平的稳定性。显示出在相对于去离子水渗析(1 : 1,000,000)之前和之后的 pH 水平(BDS, 74mg/ml, 10ml 样品体积, SpectraPor7MWC010k)。

[0054] 图 15 显示了冷冻融化后 250mg/ml 和 200mg/ml 低离子型阿达木单抗溶液的瓶子

图谱密度数据。

[0055] 图 16 显示了冷冻融化后 250mg/ml 和 200mg/ml 低离子型阿达木单抗溶液的瓶子图谱 pH 数据。

[0056] 图 17 显示了冷冻融化后 250mg/ml 和 200mg/ml 低离子型阿达木单抗溶液的瓶子图谱浓度数据。

[0057] 图 18 显示了冷冻融化后 250mg/ml 和 200mg/ml 低离子型阿达木单抗溶液的瓶子图谱重量摩尔渗透压浓度数据。

[0058] 图 19 显示了冷冻融化后 250mg/ml 和 200mg/ml 低离子型阿达木单抗溶液的瓶子图谱电导率数据。

[0059] 图 20 显示了在 DF/UF 后在 2-8°C 储存 8.5 个月（下面曲线）或在 DF/UF 后在 -80°C 储存 4.5 个月（上面曲线）的低离子型阿达木单抗（在图 20 中称作 D2E7）溶液的 SEC 分析。

[0060] 图 21 显示了在冷冻 - 融化程序之前 (T0) 和在 4 次冷冻 - 融化的每一次之后 (T1, T2, T3 和 T4) 在不同溶液和在水中配制的单克隆抗体 1D4.7 的稳定性。

[0061] 图 22 显示了在冷冻 - 融化程序之前 (T0) 和在 4 次冷冻 - 融化的每一次之后 (T1, T2, T3 和 T4) 在水中和用不同缓冲剂配制的单克隆抗体 13C5.5 的稳定性。空白 = WFI 对照样品。

[0062] 图 23 显示了在冷冻 - 融化程序之前 (T0) 和在 4 次冷冻 - 融化的每一次之后 (T1, T2, T3 和 T4) 在水中和添加不同赋形剂配制的单克隆抗体 13C5.5 的稳定性。空白 = WFI 对照样品。

[0063] 图 24 显示了阿达木单抗浓度 (WFI 制剂) 和溶液 pH 对溶液粘度的影响。

[0064] 图 25 显示了不同浓度和 pH 值的阿达木单抗溶液 (WFI 制剂) 的浊度数据。

[0065] 图 26 显示了不同 pH 值和浓度的阿达木单抗溶液 (WFI 制剂) 的流体动力学直径 ( $D_h$ ) 数据。

[0066] 图 27 显示了不同浓度的阿达木单抗在 pH5 水溶液中的按强度的大小分布图 ( $D_h$  测量)。

[0067] 图 28 显示了 100mg/mL 阿达木单抗在不同 pH 水平的水中的按强度的大小分布。

[0068] 图 29 也显示了 100mg/mL 阿达木单抗在不同 pH 水平的水中的按强度的大小分布。

[0069] 图 30 显示了水中阿达木单抗的单体含量 (SEC)。

[0070] 图 31 显示了水中阿达木单抗的聚集体含量 (SEC)。

[0071] 图 32 显示了作为溶液温度的函数的 2 种 J695 溶液 (WFI 制剂) 的粘度。

[0072] 图 33 用图形描述了在许多不同制剂的重复冷冻 / 融化 (f/t) 循环过程中通过在显微镜下才能看得见的颗粒 ( $> 1 \mu\text{m}$ ) 测量的 1D4.7 抗体稳定性。

[0073] 图 34 用图形描述了在许多不同制剂的重复冷冻 / 融化 (f/t) 循环过程中通过在显微镜下才能看得见的颗粒 ( $> 10 \mu\text{m}$ ) 测量的 13C5.5 抗体稳定性。

[0074] 图 35 用图形描述了在许多不同制剂的重复冷冻 / 融化 (f/t) 循环过程中通过在显微镜下才能看得见的颗粒 ( $> 1 \mu\text{m}$ ) 测量的 13C5.5 抗体稳定性。

[0075] 图 36 用图形描述了在许多不同制剂的重复冷冻 / 融化 (f/t) 循环过程中通过在显微镜下才能看得见的颗粒 ( $> 1 \mu\text{m}$ ) 测量的 7C6 抗体稳定性。

## 具体实施方式

### [0076] I. 定义

[0077] 为了更容易地理解本发明,首先定义一些术语。

[0078] 本文使用的术语“酸性组分”是指具有酸性 pH(即小于 7.0)的试剂,包括溶液。酸性组分的实例包括磷酸,盐酸,醋酸,柠檬酸,草酸,琥珀酸,酒石酸,乳酸,苹果酸,羟乙酸和富马酸。在一个实施方案中,本发明的水制剂不包含酸性组分。

[0079] 本文使用的术语“抗氧化剂”意在表示会抑制氧化并从而用于预防氧化过程对制品的破坏的试剂。这样的化合物包括,作为实例且不限于,丙酮,硫酸氢钠,抗坏血酸,抗坏血酸棕榈酸酯,柠檬酸,丁基化的羟基茴香醚,丁基化的羟基甲苯,氢化亚磷酸,单硫代甘油,没食子酸丙酯,蛋氨酸,抗坏血酸钠,柠檬酸钠,硫化钠,亚硫酸钠,亚硫酸氢钠,甲醛合次硫酸氢钠,巯基乙酸,偏亚硫酸氢钠,EDTA(乙二胺四乙酸盐),三胺五乙酸和本领域普通技术人员已知的其它抗氧化剂。

[0080] 术语“水制剂”是指其中溶剂是水的溶液。

[0081] 本文使用的术语“碱性组分”是指碱性(即 pH 大于 7.0)的试剂。碱性组分的实例包括氢氧化钾(KOH)和氢氧化钠(NaOH)。

[0082] 本文使用的术语“填充剂”意在表示用于增加可重配的固体的体积和/或在制备过程中辅助控制制剂的性质的化合物。这样的化合物包括,作为实例且不限于,葡聚糖,海藻糖,蔗糖,聚乙烯吡咯烷酮,乳糖,肌醇,山梨醇,二甲基亚砷,甘油,白蛋白,乳糖醛酸钙,和本领域普通技术人员已知的其它填充剂。

[0083] 本文使用的术语“电导率”是指水溶液在两个电极之间传导电流的能力。一般而言,导电性或比导电率是物质的传导电流的度量。在溶液中,电流通过离子运输来流动。因此,随着水溶液中存在的离子数量的增加,溶液会具有更高的电导率。电导率的度量单位是 mmhos (mS/cm),可以使用出售的电导率计量器来测量,例如,购自 Orion Research, Inc. (Beverly, MA)。通过改变其中的离子浓度,可以改变溶液的电导率。例如,可以改变溶液中离子型赋形剂的浓度,以便实现希望的电导率。

[0084] 本文使用的术语“冷冻保护剂”概括地包括为蛋白提供对抗冷冻诱发的应激的稳定性的试剂。冷冻保护剂的实例包括多元醇例如甘露醇,且包括糖例如蔗糖,以及包括表面活性剂例如聚山梨醇酯、泊洛沙姆或聚乙二醇,等。冷冻保护剂也有助于制剂的张力。

[0085] 本文使用的术语“超滤”或“UF”是指其中对溶液或悬浮液进行半透膜处理的任意技术,所述半透膜截留下大分子并允许溶剂和小溶质分子穿过。超滤可以用于增加溶液或悬浮液中大分子的浓度。在一个优选的实施方案中,超滤用于增加蛋白在水中的浓度。

[0086] 本文使用的术语“渗滤”或“DF”用于指一类专门的过滤,其中用溶剂稀释渗余物,并再次过滤,以降低可溶的渗透物组分的浓度。渗滤可以导致或不导致截留组分(包括,例如,蛋白)的浓度的增加。例如,在连续渗滤中,以与产生滤液相同的速率将溶剂连续加入渗余物。在该情况下,渗余物体积和截留组分的浓度在过程中不变。另一方面,在不连续的或序贯的稀释渗滤中,在超滤步骤之后是向渗余物侧加入溶剂;如果加入渗余物侧的溶剂的体积不等于或大于产生的滤液的体积,则截留组分会具有高浓度。渗滤可以用于改变大分子溶液或悬浮液的 pH、离子强度、盐组成、缓冲液组成或其它性质。

[0087] 本文使用的术语“渗滤/超滤”或“DF/UF”是指序贯或同时完成超滤和/或渗滤的任意过程、技术或技术组合。

[0088] 本文使用的术语“渗滤步骤”是指在渗滤处理中总体积交换。

[0089] 术语“赋形剂”是指可以加入制剂中来提供希望的稠度（例如，改变容积性质）、提高稳定性和/或调节重量摩尔渗透压浓度的试剂。常用的赋形剂的实例包括、但不限于，糖，多元醇，氨基酸，表面活性剂，和聚合物。在本文中可互换使用的术语“离子型赋形剂”或“可离子化赋形剂”是指具有净电荷的试剂。在一个实施方案中，离子型赋形剂在某些制剂条件（例如 pH）下具有净电荷。离子型赋形剂的实例包括、但不限于，组氨酸，精氨酸，和氯化钠。在本文中可互换使用的术语“非离子型赋形剂”或“非可离子化赋形剂”是指不具有净电荷的试剂。在一个实施方案中，非离子型赋形剂在某些制剂条件（例如 pH）下不具有净电荷。非离子型赋形剂的实例包括、但不限于，糖（例如，蔗糖），糖醇（例如，甘露醇），和非离子型表面活性剂（例如，聚山梨醇酯 80）。

[0090] 本文使用的术语“第一蛋白溶液”或“第一溶液”是指用于本发明的方法中的起始蛋白溶液或原料，即渗滤进水的起始蛋白溶液。在一个实施方案中，第一蛋白溶液包含离子型赋形剂、非离子型赋形剂和/或缓冲系统。

[0091] 术语颗粒的“流体动力学直径”或“ $D_h$ ”是指具有水的密度和与颗粒相同的速度的球的直径。因而，本文使用的术语“蛋白的流体动力学直径”是指使用动态光散射（DLS）测得的溶液中蛋白的大小。DLS-测量仪器会以固定的散射角测量从溶液中的蛋白散射的光的强度的时间依赖性波动。从强度的时间依赖性波动的强度自相关函数确定蛋白  $D_h$ 。使用 DLS 仪器软件处理散射强度数据，以确定散射分子（即蛋白样本）的流体动力学直径的值和尺寸分布。

[0092] 本文使用的术语“冻干保护剂”包括在干燥或冷冻干燥过程中去除水时为蛋白提供稳定性的试剂，例如，通过维持蛋白的适当构象。冻干保护剂的实例包括糖，尤其二糖或三糖。冷冻保护剂也可以提供冻干保护剂效应。

[0093] 当提及组合物例如水制剂时，本文使用的术语“药物”可以用于治疗疾病或病症。

[0094] 术语“蛋白”意在包括这样的氨基酸序列，其链长度足以产生更高水平的二级和/或三级和/或四级结构。这是为了区别于不具有这种结构的“肽”或其它小分子量药物。在一个实施方案中，本文使用的蛋白具有至少约 47kD 的分子量。在本文使用的定义中包含的蛋白的实例包括治疗蛋白。“治疗活性的蛋白”或“治疗蛋白”是指可以用于治疗目的（即用于治疗受试者的病症）的蛋白。应当指出，尽管治疗蛋白可以用于治疗目的，本发明不限于这样的用途，因为所述蛋白也可以用于体外研究。在一个优选的实施方案中，治疗蛋白是融合蛋白或抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中，本发明的方法和组合物包含至少两种不同的蛋白，它们定义为具有不同氨基酸序列的两种蛋白。其它不同的蛋白不包括蛋白的降解产物。

[0095] 本文使用的短语“将蛋白溶于水”是指蛋白制剂，其中将蛋白溶于已经通过 DF/UF 处理减少其中小分子（例如，缓冲剂，赋形剂，盐，表面活性剂）的数量水溶液。尽管通过 DF/UF 处理不能在绝对意义上完全消除小分子，通过应用 DF/UF 可实现的理论上的赋形剂减少足以排它地主要在水中建立蛋白制剂。例如，以连续模式 DF/UF 方法使用 6 体积交

换,理论上的赋形剂减少是 $\sim 99.8\%$  ( $c_i = e^{-x}$ ,其中  $c_i$  是起始赋形剂浓度,  $x$  是体积交换数目)。

[0096] 术语“药物制剂”是指这样的制品,其形式允许活性成分的生物活性有效、且因此可以施用给受试者用于治疗用途。

[0097] “稳定的”制剂是这样的制剂,其中的蛋白在储存后基本上保留它的物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物活性。用于测量蛋白稳定性的各种分析技术可从本领域获知,评论见,例如, *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) 和 Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)。在一个实施方案中,根据溶液中单体蛋白的百分比,降解的(例如,破碎的)和/或聚集的蛋白的低百分比,确定蛋白的稳定性。例如,包含稳定蛋白的水制剂可以包括至少 95% 单体蛋白。或者,本发明的水制剂可以包括不超过 5% 聚集体和/或降解的蛋白。

[0098] 术语“稳定剂”是指提高或另外地增强稳定性的赋形剂。稳定剂包括、但不限于,  $\alpha$ -硫辛酸,  $\alpha$ -生育酚,抗坏血酸棕榈酸酯,苯甲醇,生物素,重亚硫酸盐,硼,丁基化的羟基茴香醚(BHA),丁基化的羟基甲苯(BHT),抗坏血酸和它的酯,类胡萝卜素,柠檬酸钙,乙酰基-L-肉碱,螯合剂,软骨素,铬,柠檬酸,辅酶 Q-10,半胱氨酸,半胱氨酸盐酸盐,3-去氢莽草酸(DHS), EDTA(乙二胺四乙酸;乙二胺四乙酸二钠),硫酸亚铁,叶酸,富马酸,没食子酸烷基酯,大蒜,葡糖胺,葡萄籽提取物, gugal, 镁,苹果酸,偏亚硫酸氢盐, N-乙酰基半胱氨酸,烟酸,烟酰胺,苜蓿根,鸟氨酸,没食子酸丙酯, pycnogenol, 沙巴棕,硒,亚硫酸氢钠,偏重亚硫酸钠,亚硫酸钠,亚硫酸钾,酒石酸,硫代硫酸盐,硫代甘油,硫代山梨醇,生育酚和它们的酯,例如,生育酚醋酸酯,生育酚琥珀酸酯, tocotrienal, d- $\alpha$ -生育酚醋酸酯,维生素 A 和它的酯,维生素 B 和它的酯,维生素 C 和它的酯,维生素 D 和它的酯,维生素 E 和它的酯,例如,维生素 E 醋酸酯,锌,和它们的组合。

[0099] 术语“表面活性剂”概括地包括这样的试剂,它们保护蛋白免受空气/溶液界面诱发的应激和溶液/表面诱发的应激。例如表面活性剂可以保护蛋白免于聚集。合适的表面活性剂可以包括,例如,聚山梨醇酯,聚氧乙烯烷基醚例如 Brij 35. RTM. 或泊洛沙姆例如吐温 20,吐温 80 或泊洛沙姆 188。优选的去污剂是泊洛沙姆,例如,泊洛沙姆 188,泊洛沙姆 407;聚氧乙烯烷基醚,例如 Brij 35. RTM., 克列莫佛(Cremophor) A25, Sympatens ALM/230;和聚山梨醇酯/吐温,例如,聚山梨醇酯 20,聚山梨醇酯 80,和泊洛沙姆,例如,泊洛沙姆 188,和吐温,例如,吐温 20 和吐温 80。

[0100] 本文使用的术语“张力调节剂”意在表示可以用于调节液体制剂的张力的一种或复数种化合物。合适的张力调节剂包括甘油,乳糖,甘露醇,右旋糖,氯化钠,硫酸镁,氯化镁,硫酸钠,山梨醇,海藻糖,蔗糖,棉子糖,麦芽糖和本领域普通技术人员已知的其它物质。在一个实施方案中,液体制剂的张力接近血液或血浆的张力。

[0101] 术语“水”意在表示已经纯化(通常通过蒸馏或反渗透)去除污染物的水,在本文中 also 指“纯水”。在一个优选的实施方案中,在本发明的方法和组合物中使用的水不含有赋形剂。在一个实施方案中,水包括适合施用给受试者的无菌水。在另一个实施方案中,水意在包括注射用水(WFI)。在一个实施方案中,水是指蒸馏水或适用于体外试验的水。在一个优选的实施方案中,仅使用水作为渗滤介质,根据本发明的方法进行渗滤。

[0102] 本文使用的术语“抗体”包括完整抗体和其任意抗原结合片段(即“抗原结合

部分” ) 或单链。” 抗体” 是指包含通过二硫键相互连接的至少 2 个重 (H) 链和 2 个轻 (L) 链的糖蛋白或其抗原结合部分。每个重链包含一个重链可变区 ( 在本文中缩写为  $V_H$  ) 和一个重链恒定区。重链恒定区包含 3 个结构域, CH1, CH2 和 CH3。每个轻链包含一个轻链可变区 ( 在本文中缩写为  $V_L$  ) 和一个轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域 CL。  $V_H$  和  $V_L$  区域可以进一步细分成称作互补性决定区 (CDR) 的超变区, 其点缀在称作框架区 (FR) 的更保守的区域中。每个  $V_H$  和  $V_L$  由 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成, 它们按照下述次序从氨基端向羧基端排列 :FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合, 所述因子包括免疫系统的不同细胞 ( 例如, 效应细胞 ) 和经典补体系统的第一组分 (C1q)。

[0103] 本文使用的术语抗体的” 抗原结合部分” ( 或简称” 抗体部分” ) 是指抗体的一个或更多个片段, 其保留特异性地结合抗原 ( 例如, TNF  $\alpha$ , IL-12 ) 的能力。已经证实, 抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来实现。术语抗体的” 抗原结合部分” 所包含的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 由  $V_L$ 、 $V_H$ 、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段 ;(ii)  $F(ab' )_2$  片段, 包含在铰链区通过二硫桥连接的 2 个 Fab 片段的二价片段 ;(iii) 由  $V_H$  和  $C_H1$  结构域组成的 Fd 片段 ;(iv) 由抗体的单个臂的  $V_L$  和  $V_H$  结构域组成的 Fv 片段, (v) dAb 片段 (Ward 等人, (1989) Nature 341 :544-546), 它由  $V_H$  或  $V_L$  结构域组成 ;和 (vi) 分离的互补性决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的 2 个结构域  $V_L$  和  $V_H$  由分开的基因编码, 使用重组方法, 可以通过合成的连接物使它们结合, 将它们制成单个蛋白链, 其中  $V_L$  和  $V_H$  区域配对, 形成单价分子 ( 称作单链 Fv (scFv) ; 参见例如, Bird 等人 (1988) Science 242 :423-426 ;和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883)。这样的单链抗体也包含在术语抗体的” 抗原结合部分” 中。使用本领域技术人员已知的常规技术, 得到这些抗体片段, 并以与完整抗体相同的方式, 筛选片段的效用。在本发明的一个实施方案中, 抗体片段选自 :Fab, Fd, Fd' , 单链 Fv (scFv) , scFv<sub>a</sub>, 和结构域抗体 (dAb)。

[0104] 更进一步, 抗体或其抗原结合部分可以是更大的免疫粘附分子的一部分, 所述更大的免疫吸附分子由抗体或抗体部分与一个或更多个其它蛋白或肽的共价或非共价缔合来形成。这些其它蛋白或肽可以具有下述功能, 即允许纯化抗体或其抗原结合部分或允许它们彼此或与其它分子缔合。因而, 这样的免疫粘附分子的实例包括使用抗生蛋白链菌素核心区来制备四聚体单链可变片段 (scFv) 分子 (Kipriyanov 等人 (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6 :93-101) 和使用半胱氨酸残基、标记肽和 C- 末端聚组氨酸标签来制备二价和生物素化的 scFv 分子 (Kipriyanov 等人 (1994) Mol. Immunol. 31 :1047-1058)。使用常规技术, 例如分别用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化完整抗体, 可以从完整抗体制备抗体部分, 例如 Fab 和  $F(ab' )_2$  片段。此外, 使用标准的重组 DNA 技术, 可以得到抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

[0105] 当它们属于形成同源对或组的结构家族或源自这样的家族且保留该特征时, 2 个抗体结构域是” 互补的” 。例如, 抗体的  $V_H$  结构域和  $V_L$  结构域是互补的 ;2 个  $V_H$  结构域不是互补的, 2 个  $V_L$  结构域不是互补的。在免疫球蛋白超家族的其它成员中可以发现互补结构域, 例如 T- 细胞受体的  $V\alpha$  和  $V\beta$  ( 或  $\gamma$  和  $\delta$  ) 结构域。

[0106] 术语” 结构域” 是指折叠的蛋白结构, 其独立于蛋白的其它部分地保留它的三级结构。一般而言, 结构域负责蛋白的独立的功能性质, 且在许多情况下, 可以添加、去除或转

移至其它蛋白,而不丧失蛋白的剩余部分和/或结构域的功能。单个抗体可变结构域是指折叠的多肽结构域,其包含抗体可变结构域的序列特征。因此,它包括完整的抗体可变结构域和修饰的可变结构域,例如其中一个或更多个环被替换为不是抗体可变结构域特征性的序列,或已经截短的或包含N-或C-末端延伸的抗体可变结构域,以及至少部分地保留全长结构域的结合活性和特异性的折叠的可变结构域片段。

[0107] 可以组合本发明的可变结构域,形成一组结构域;例如,可以组合互补结构域,例如V<sub>L</sub>结构域可以与V<sub>H</sub>结构域组合。也可以组合非互补结构域。可以以许多方式组合结构域,包含通过共价或非共价方式连接结构域。

[0108] "dAb"或"结构域抗体"是指特异性地结合抗原的单个抗体可变结构域(V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>)多肽。

[0109] 本文使用的术语"抗原结合区"或"抗原结合部位"是指抗体分子的部分或其抗原结合部分,它含有与抗原相互作用的氨基酸残基,且赋予抗体对抗原的特异性和亲和力。

[0110] 术语"表位"意在指能在一个或更多个抗体的抗原结合区被抗体识别和结合的任意分子的部分。在本发明的上下文中,第一和第二"表位"理解为不同的且不被单个单特异性抗体或其抗原结合部分结合的表位。

[0111] 短语"重组抗体"是指通过重组方式制备的、表达的、建立的或分离的抗体,例如使用转染进宿主细胞的重组表达载体表达的抗体,从重组的、组合的抗体文库分离的抗体,从人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如,小鼠)分离的抗体(参见例如,Taylor等人(1992)Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或通过任意其它方式制备、表达、建立或分离的抗体,所述其它方式包括将特定免疫球蛋白基因序列(例如人免疫球蛋白基因序列)剪接到其它DNA序列。重组抗体的实例包括嵌合的、CDR-移植的和人化的抗体。

[0112] 术语"人抗体"是指具有与例如Kabat等人(参见Kabat,等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S. Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)所述的人种系免疫球蛋白序列相对应的或源自它们的可变区和恒定区的抗体。但是,本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过随机的或位点特异性的体外诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDRs和尤其CDR3中。

[0113] 本发明的重组人抗体具有可变区,也可以包含恒定区域,它们源自人种系免疫球蛋白序列(参见Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S. Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)。但是,在某些实施方案中,对这样的重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用人Ig序列的转基因动物时,体内体细胞诱变),因而重组抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区域的氨基酸序列是这样的序列,尽管它们源自人种系V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列且与之相关,可能在体内人抗体种系全集内不天然存在。但是,在某些实施方案中,这样的重组抗体是选择性诱变或回复突变或二者的结果。

[0114] 术语"回复突变"是指这样的过程,其中有些或全部体细胞突变的人抗体氨基酸被替换为来自同源种系抗体序列的对应种系残基。将本发明的人抗体的重链和轻链序列分别与VBASE数据库中的种系序列相比对,以鉴别具有最高同源性的序列。通过诱变编码这些不同氨基酸的确定的核苷酸位置,将本发明的人抗体中的差异回复至种系序列。应当研

究这样鉴别出的每个氨基酸作为回复突变候选物的作用,在抗原结合中起直接还是间接作用,且在最终的人抗体中不应当包含突变后发现会影响人抗体的任意期望特征的任意氨基酸。为了使发生回复突变的氨基酸的数目最小化,可以保留发现的不同于最接近的种系序列、但是与第二种系序列中的对应氨基酸相同的那些氨基酸位置,条件是,第二种系序列与本发明的人抗体序列在所讨论氨基酸的两侧有至少 10 个、优选 12 个氨基酸相同且共线性。回复突变可以发生在抗体优化的任意阶段。

[0115] 术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列和来自另一个物种的恒定区序列,例如具有连接到人恒定区域上的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0116] 术语“CDR-移植的抗体”是指这样的抗体,其包含来自一个物种的重链和轻链可变区序列,但是其中  $V_H$  和 / 或  $V_L$  的一个或多个 CDR 区域的序列被替换为另一个物种的 CDR 序列,例如具有鼠重链和轻链可变区的抗体,其中一个或多个鼠 CDR (例如, CDR3) 已经被替换为人 CDR 序列。

[0117] 术语“人化的抗体”是指这样的抗体,其包含来自非人物种(例如,小鼠)的重链和轻链可变区序列,但是其中至少一部分  $V_H$  和 / 或  $V_L$  序列已经被改变成更“象人的”,即,更类似于人种系可变序列。一类人化的抗体是 CDR-移植的抗体,其中人 CDR 序列被引入非人  $V_H$  和  $V_L$  序列,以替换对应的非人 CDR 序列。

[0118] 在下面的子部分中,更详细地描述了本发明的不同方面。

[0119] II. 本发明的方法

[0120] 一般而言,渗滤是使用膜来从含有蛋白、肽、核酸和其它生物分子的溶液去除、替换或降低盐或溶剂的浓度的技术。蛋白生产操作经常包含,已经从由它的表达产生的杂质(例如宿主细胞蛋白)纯化出蛋白后,将蛋白溶液最后渗滤进制剂缓冲液。本文所述的发明提供了获取水制剂的方法,其中只使用水作为渗滤溶液,对蛋白溶液进行渗滤。因而,本发明的制剂是基于使用水作为渗滤处理中的制剂介质,不依赖于包括赋形剂(例如表面活性剂)的传统制剂介质,所述赋形剂用于溶解和 / 或稳定化最终制剂中的蛋白。本发明提供了将蛋白转入用于稳定制剂的纯水中的方法,其中所述蛋白保持在溶液中,且能高水平浓缩,无需使用其它试剂来维持它的稳定性。

[0121] 根据本文的教导进行渗滤或 DF/UF 之前,所述方法包括,首先提供在第一溶液中的蛋白。蛋白可以在任意第一溶液中配制,包括使用本领域众所周知的技术的配制,例如合成技术(例如,重组技术,肽合成或其组合)。或者,用在本发明的方法和组合物中的蛋白分离自蛋白的内生性来源。使用其中从蛋白的异质混合物纯化蛋白的纯化过程,可以得到起始蛋白溶液。在一个实施方案中,通过其中对在哺乳动物表达系统中表达的蛋白(包括抗体)进行许多色谱步骤来从蛋白溶液去除宿主细胞蛋白(HCPs)的纯化方法,得到用于本发明的起始蛋白溶液。在一个实施方案中,从哺乳动物细胞表达系统得到第一蛋白溶液,且已经纯化以去除宿主细胞蛋白(HCPs)。纯化的方法描述在美国申请号 11/732,918 (US 20070292442),其通过援引并入本文。应当指出,根据本发明的方法不需要特别制备第一蛋白溶液。

[0122] 可以用于本发明的组合物和方法中的蛋白可以是任意大小即分子量( $M_w$ )。例如,蛋白可以具有等于或大于约 1kDa 的  $M_w$ ,等于或大于约 10kDa 的  $M_w$ ,等于或大于约 47kDa 的

$M_w$ , 等于或大于约 57kDa 的  $M_w$ , 等于或大于约 100kDa 的  $M_w$ , 等于或大于约 150kDa 的  $M_w$ , 等于或大于约 200kDa 的  $M_w$ , 或等于或大于约 250kDa 的  $M_w$ 。上述  $M_w$  之间的数字, 例如, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 153, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 依此类推, 以及本文所述的所有其它数字, 也构成本发明的一部分。使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围, 也被包括在本发明的范围内。例如, 用于本发明的蛋白的大小范围可以是 57kDa 至 250kDa, 56kDa 至 242kDa, 60kDa 至 270kDa, 依此类推。

[0123] 本发明的方法也包括渗滤包含至少 2 种不同蛋白的第一蛋白溶液。例如, 蛋白溶液可以含有两类或更多类针对不同分子或相同分子的不同表位的抗体。

[0124] 在一个实施方案中, 在溶液中的蛋白是治疗蛋白, 包括, 但不限于, 融合蛋白和酶。治疗蛋白的实例包括、但不限于, 阿法链道酶 (链道酶  $\alpha$ ), Regranex (贝卡普勒明), Activase (阿替普酶), Aldurazyme (Laronidase), Amevive (Alefcept), Aranesp (Darbepoetin  $\alpha$ ), 贝卡普勒明浓缩剂, Betaseron (干扰素  $\beta$ -1b), BOTOX (A 型肉毒毒素), Elitek (拉布立酶), Elspar (门冬酰胺酶), Epogen (阿法依伯汀), Enbrel (依那西普), Fabrazyme (Agalsidase  $\beta$ ), 干复津 (干扰素  $\alpha$ -1), 干扰能 (干扰素  $\alpha$ -2a), Kineret (阿那白滞素), MYOBLOC (B 型肉毒毒素), Neulasta (Pegfilgrastim), Neumega (奥普瑞白介素), 优保津 (非格司亭), Ontak (地尼白介素-毒素连接物), PEGASYS (Peginterferon  $\alpha$ -2a), Proleukin (阿地白介素), 阿法链道酶 (链道酶  $\alpha$ ), Rebif (干扰素  $\beta$ -1a), Regranex (贝卡普勒明), Retavase (瑞替普酶), Roferon-A (干扰素  $\alpha$ -2), TNKase (替奈普酶), 和 Xigris (Drotrecogin  $\alpha$ ), Arcalyst (Riloncept), NPlate (Romiplostim), Mircera (甲氧基聚乙二醇-红细胞生成素  $\beta$ ), Cinryze (C 1 酯酶抑制剂), Elaprase (idursulfase), Myozyme (alglucosidase  $\alpha$ ), Orencia (abatacept), Naglazyme (galsulfase), Kepivance (palifermin) 和 Actimmune (干扰素  $\gamma$ -1b)。

[0125] 用于本发明的蛋白也可以是抗体或其抗原结合片段。可以用于本发明的抗体的实例包括嵌合抗体, 非人抗体, 人抗体, 人化的抗体, 和结构域抗体 (dAbs)。在一个实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是抗-TNF  $\alpha$  和 / 或抗-IL-12 抗体 (例如, 它可以是双可变结构域 (DVD) 抗体)。可以用于本发明的方法和组合物中的抗体或其抗原结合片段的其它实例包括、但不限于, 1D4.7 (抗-IL-12/IL-23 抗体; Abbott Laboratories), 2.5(E)mg1 (抗-IL-18; Abbott Laboratories), 13C5.5 (抗-IL-13 抗体; Abbott Laboratories), J695 (抗-IL-12; Abbott Laboratories), 阿非莫单抗 (Fab 2 抗-TNF; Abbott Laboratories), Humira (阿达木单抗) Abbott Laboratories), Campath (阿仑单抗), CEA-Scan 阿西莫单抗 (fab 片段), Erbitux (西妥昔单抗), Herceptin (曲妥单抗), Myoscint (戊酸印西洛马), ProstaScint (卡罗单抗喷地肽), Remicade (英夫利昔单抗), ReoPro (阿昔单抗), Rituxan (利妥昔单抗), Simulect (巴利昔单抗), Synagis (帕利珠单抗), Verluma (若莫单抗), Xolair (Omalizumab), Zenapax (达珠单抗), Zevalin (替伊莫

单抗), Orthoclone OKT3(莫罗单抗-CD3), Panorex(依决洛单抗), Mylotarg(吉姆单抗奥佐米星), golimumab(Centocor), Cimzia(Certolizumab pegol), Soliris(Eculizumab), CNT0 1275(ustekinumab), Vectibix(panitumumab), Bexxar(托西莫单抗和 I<sup>131</sup>托西莫单抗), 如整个内容通过援引并入本文的国际申请 W0 2007/149032(Cambridge Antibody Technology) 所述的抗-IL-17 抗体抗体 7, 抗-IL-13 抗体 CAT-354(Cambridge Antibody Technology), 抗-人 CD4 抗体 CE9y4PE (IDEC-151, 克立昔单抗)(Biogen IDEC/Glaxo Smith Kline), 抗-人 CD4 抗体 IDEC CE9.1/SB-210396(凯利昔单抗)(Biogen IDEC), 抗-人 CD80 抗体 IDEC-114(galiximab)(Biogen IDEC), 抗-狂犬病毒蛋白抗体 CR4098(foravirumab), 和抗-人 TNF 相关的诱导细胞凋亡的配体受体 2(TRAIL-2) 抗体 HGS-ETR2(lexatumumab)(Human Genome Sciences, Inc.), 和 Avastin(贝伐单抗)。

[0126] 下面提供了生产抗体的技术。

[0127] 多克隆抗体

[0128] 多克隆抗体通常指对某些抗原是特异性的、但是结合所述抗原上的不同表位的抗体的混合物。通常通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关的抗原和佐剂,在动物中产生多克隆抗体。使用双功能试剂或衍生试剂,例如马来酰亚氨基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl<sub>2</sub>或 R<sub>1</sub>NCNR(其中 R 和 R<sub>1</sub>是不同的烷基),将相关抗原缀合到对于要免疫的物种是免疫原性的蛋白上,例如,钥孔戚血蓝素,血清白蛋白,牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,是有用的。制备多克隆抗体的方法是本领域已知的,描述在,例如, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Lane and Harlow(1988),其通过援引并入本文。

[0129] 单克隆抗体

[0130] 本文使用的“单克隆抗体”意在指杂交瘤衍生的抗体(例如,由通过杂交瘤技术制备的杂交瘤分泌的抗体,例如标准的 Kohler 和 Milstein 杂交瘤方法)。例如,使用 Kohler 等人, *Nature*, 256 :495(1975) 首先描述的杂交瘤方法,可以制备单克隆抗体,或可以通过重组 DNA 方法(美国专利号 4,816,567)来制备。因而,本发明的杂交瘤-衍生的双特异性抗体仍然称作单克隆抗体,尽管它具有对超过单一抗原的抗原特异性。

[0131] 从许多基本上均质的抗体(即构成群体的各个抗体是同一的,只是可能以微量存在可能天然存在的突变)得到单克隆抗体。因而,修饰语“单克隆的”表示抗体不是独立抗体的混合物的特征。

[0132] 在另一个实施方案中,从使用 McCafferty 等人, *Nature*, 348 :552-554(1990) 所述的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体。Clackson 等人, *Nature*, 352 :624-628(1991) 和 Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597(1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后来的出版物描述了通过链改组生产高亲和力(nM 范围)人抗体(Marks 等人, *Bio/Technology*, 10 :779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse 等人, *Nuc. Acids. Res.*, 21 :2265-2266(1993))。因而,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代技术。

[0133] 使用表达文库,如美国专利号 6,423,538、6,696,251、6,699,658、6,300,065、6,399,763 和 6,114,147 所述,也可以从酵母和其它真核细胞分离抗体和抗体片段。可以改造真核细胞来表达文库蛋白,包括来自组合抗体文库,用于显示在细胞表面,允许用亲和力

选择含有抗体的文库克隆的特定细胞,以选择靶分子。从分离的细胞回收后,可以从合适的哺乳动物细胞系高水平地表达编码目标抗体的文库克隆。

[0134] 用于开发目标抗体的其它方法包括使用核酸展示技术的无细胞筛选,其描述在美国专利号

[0135] 7, 195, 880 ;6, 951, 725 ;7, 078, 197 ;7, 022, 479, 6, 518, 018 ;7, 125, 669 ;6, 846, 655 ;

[0136] 6, 281, 344 ;6, 207, 446 ;6, 214, 553 ;6, 258, 558 ;6, 261, 804 ;6, 429, 300 ;6, 489, 116 ;

[0137] 6, 436, 665 ;6, 537, 749 ;6, 602, 685 ;6, 623, 926 ;6, 416, 950 ;6, 660, 473 ;6, 312, 927 ;

[0138] 5, 922, 545 ;和 6, 348, 315。这些方法可以用于以蛋白物理地缔合或结合它的来源核酸的方式,体外从核酸转录蛋白。通过用靶分子选择表达的蛋白,也会选择出编码蛋白的核酸。在无细胞筛选技术的一个变体中,可以分离从免疫系统细胞分离出的抗体序列,并进行部分随机化的聚合酶链式反应诱变技术来增加抗体多样性。然后在无细胞系统中表达这些部分随机化的抗体基因,同时在核酸和抗体之间建立物理缔合。

[0139] 也可以修饰 DNA,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列替代同源鼠序列(美国专利号 4, 816, 567 ;Morrison, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851(1984)),或通过将免疫球蛋白编码序列共价连接至非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列。

[0140] 通常,用这样的非免疫球蛋白多肽置换抗体的恒定结构域,或用它们置换抗体的一个抗原结合部位的可变结构域,以建立嵌合二价抗体,后者包含对一个抗原具有特异性的抗原结合部位和对一个不同抗原具有特异性的另一个抗原结合部位。

[0141] 使用合成蛋白化学的已知方法,包括包含交联剂的那些方法,也可以体外制备嵌合或杂合抗体。例如,使用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键,可以构建免疫毒素。适用于该目的的试剂的实例包括 iminothiolate 和甲基 -4-mercaptobutyrimidate。

[0142] 人化的抗体

[0143] 用于人化非人抗体的方法是本领域众所周知的。一般而言,人化抗体具有一个或更多个从非人来源引入其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基经常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变结构域。人化基本上可以按照 Winter 等人(Jones 等人, Nature, 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等人, Nature, 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen 等人, Science, 239 :1534-1536(1988))的方法来实现,其中用非人(例如,啮齿动物)CDRs 或 CDR 序列置换对应的人抗体序列。因此,这样的“人化的”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4, 816, 567),其中大大小于完整人可变结构域已经被置换为来自非人物种的对应序列。在实践中,人化的抗体通常是人抗体,其中有些 CDR 残基和可能的一些框架(FR)残基被置换为来自啮齿动物抗体的类似部位的残基。描述人化过程的其它参考文献包括 Sims 等人, J. Immunol., 151 :2296(1993) ;Chothia 等人, J. Mol. Biol., 196 :901(1987) ;Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992) ;Presta 等人, J. Immunol., 151 :2623(1993),它们各自通过援引并入本文。

[0144] 人抗体

[0145] 或者,现在可能生产转基因动物(例如,小鼠),其在免疫接种后能生产人抗体全集,且不生成内源性免疫球蛋白。例如,已经描述,嵌合的和种系突变的小鼠中抗体重链连接区( $J_H$ )基因的纯合型缺失,会导致内源性抗体生成的完全抑制。在这样的种系突变型小鼠中的转入人种系免疫球蛋白基因阵列,会导致在抗原攻击后生成成人抗体。参见,例如,

Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993) ;Jakobovits 等人, Nature, 362 :255-258(1993) ;Bruggermann 等人, Year in Immune, 7 :33(1993)。也可以从噬菌体展示文库衍生出人抗体 (Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227 :381(1991) ;Marks 等人, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991))。

[0146] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含结合人 TNF $\alpha$  的抗体或其抗原结合部分,包括,例如,阿达木单抗(也称作 Humira,阿达木单抗或 D2E7 ;Abbott Laboratories)。在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,以  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  或更小的  $K_d$  和  $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$  或更小的  $K_{\text{off}}$  速率常数(二者都通过表面等离子体共振来测定)与人 TNF $\alpha$  解离,并在标准的体外 L929 测定中以  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  或更小的  $\text{IC}_{50}$  中和人 TNF $\alpha$  细胞毒性。制备对人 TNF $\alpha$  具有高亲和力的人中和抗体的实例和方法,包括抗体的序列,描述在通过援引并入本文的美国专利号 6,090,382(称作 D2E7)中。

[0147] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含结合人 IL-12 的抗体或其抗原结合部分,包括,例如,抗体 J695(Abbott Laboratories ;也称作 ABT-874)(美国专利号 6,914,128)。J695 是用于靶向和中和白细胞介素 -12 和白细胞介素 -23 的全人单克隆抗体。在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段具有下述特征:它以  $3 \times 10^{-7} \text{M}$  或更小的  $K_d$  与人 IL-1 $\alpha$  解离;以  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  或更小的  $K_d$  与人 IL-1 $\beta$  解离;且不结合小鼠 IL-1 $\alpha$  或小鼠 IL-1 $\beta$ 。制备对人 IL-12 具有高亲和力的人中和抗体的实例和方法,包括抗体的序列,描述在通过援引并入本文的美国专利号 6,914,128 中。

[0148] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含结合人 IL-18 的抗体或其抗原结合部分,包括,例如,抗体 2.5(E)mg1(Abbott Bioresearch ;也称作 ABT-325)(参见美国专利申请号 2005/0147610,其通过援引并入本文)。

[0149] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含抗 -IL-12/ 抗 -IL-23 抗体或其抗原结合部分,它是抗体 1D4.7(Abbott Laboratories ;也称作 ABT-147)(参见 WO 2007/005608 A2,于 2007 年 1 月 11 日公开,其通过援引并入本文)。

[0150] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含抗 -IL-13 抗体或其抗原结合部分,它是抗体 13C5.5(Abbott Laboratories ;也称作 ABT-308)(参见 PCT/US2007/19660(WO 08/127271),其通过援引并入本文)。

[0151] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含抗体或其抗原结合部分,它是抗体 7C6,抗 -淀粉状蛋白  $\beta$  抗体(Abbott Laboratories ;参见 PCT 公开 WO 07/062852,其通过援引并入本文)。

[0152] 双特异性抗体

[0153] 双特异性抗体(BsAbs)是对至少 2 种不同表位具有结合特异性的抗体。这样的抗体可以源自全长抗体或抗体片段(例如,  $\text{F}(\text{ab}')_2$  双特异性抗体)。

[0154] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产是基于 2 条免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达,其中 2 条链具有不同的特异性(Millstein 等人, Nature, 305 :537-539(1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(细胞杂交瘤)生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱步骤实现的正确分子的纯化是相当麻烦的,且产率很低。类似的操作公开在 WO 93/08829 和 Traunecker 等人, EMBO J., 10 :3655-3659(1991)。

[0155] 根据一个不同的方案,将具有希望的结合特异性(抗体-抗原结合部位)的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。

[0156] 融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定结构域,其包含铰链、CH2 和 CH3 区域的至少一部分。优选地具有含有轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1),其存在于至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要)免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染进合适的宿主生物体。在在构建中使用不同比例的 3 种多肽链会提供最佳产率的实施方案中,这为调节这 3 种多肽片段的相互比例提供巨大灵活性。但是,当至少 2 种多肽链的同比例表达会导致高产率时或当比例不是特别重要时,可以将 2 种或所有 3 种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

[0157] 在该方案的一个优选实施方案中,双特异性抗体由在一条臂中的杂种免疫球蛋白重链(具有第一种结合特异性)和在另一条臂中的杂种免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二种结合特异性)组成。发现该不对称结构有助于从不希望的免疫球蛋白链组合分离希望的双特异性化合物,因为免疫球蛋白轻链仅在一半双特异性分子中的存在会提供便利的分离方式。该方案公开在 1994 年 3 月 3 日公开的 WO 94/04690 中。关于生产双特异性抗体的其它细节,参见,例如, Suresh 等人, *Methods in Enzymology*, 121 :210(1986)。

[0158] 双特异性抗体包括交联的或“异源缀合物”抗体。例如,异源缀合物中的抗体之一可以偶联至抗生物素蛋白,其它抗体偶联至生物素。已经提出,例如,这样的抗体会将免疫系统细胞靶向不希望的细胞(美国专利号 4,676,980),和用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360, WO 92/200373, 和 EP 03089)。异源缀合物抗体可以使用任意方便的交联方法来制备。合适的交联剂是本领域众所周知的,与许多交联技术一起公开在美国专利号 4,676,980 中。

[0159] 在文献中还已经描述了从抗体片段生产双特异性抗体的技术。下述技术也可以用于生产二价抗体片段,后者不一定是双特异性的。例如,可以在体外化学地偶联从大肠杆菌回收的 Fab' 片段,形成二价抗体。参见, Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225(1992)。

[0160] 还已经描述了从重组细胞培养物直接制备和分离二价抗体片段的各种技术。例如,使用亮氨酸拉链,已经生产出二价异源二聚体。Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5) :1547-1553(1992)。通过基因融合,将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽连接至 2 种不同抗体的 Fab' 部分。在铰链区还原抗体同型二聚体,形成单体,然后重新氧化,形成抗体异源二聚体。Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :6444-6448(1993) 所述的“双抗体(diabody)”技术已经为制备双特异性/二价抗体片段提供了可选机理。所述片段包含通过连接物连接到轻链可变结构域( $V_L$ )上的重链可变结构域( $V_H$ ),所述连接物足够短,以允许在相同链上的 2 个结构域之间配对。因此,强迫一个片段的  $V_H$  和  $V_L$  结构域与另一个片段的互补  $V_L$  和  $V_H$  结构域配对,从而形成 2 个抗原结合位点。还已经报道了通过使用单链 Fv(sFv) 二聚体来制备双特异性/二价抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152 :5368(1994)。

[0161] 在一个实施方案中,本发明的制剂包含对 IL-1(包括 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ) 双特异性的抗体。制备双特异性 IL-1 抗体的实例和方法,可以参见 2006 年 12 月 29 日提交的美国临时申请号 60/878165。

[0162] 渗滤/超滤(在本文中通常也称作 DF/UF) 选择性地利用透性的(多孔的)膜过

滤器来分离溶液和悬浮液的组分,这基于它们的分子大小。膜会截留大于膜孔的分子,而可透过的更小的分子例如盐、溶剂和水自由地穿过膜。被膜截留的溶液称作浓缩物或渗余物。穿过膜的溶液称作滤液或渗透物。选择浓缩膜的一个参数是它对要浓缩的样品的截留特征。作为一般规律,膜的分子量截止(MWCO)应当是要截留的分子的分子量的1/3至1/6。这是为了确保完全截留。MWCO越接近样品的分子量,在浓缩过程中损失一些小产物的风险越大。可以用于本发明的方法的膜的实例包括Omega™ PES膜(30kDa MWCO,即大于30kDa的分子被膜截留,小于30kDa的分子允许穿到膜的滤液侧)(Pall Corp.,Port Washington, NY);**Millex**®-GV注射器驱动过滤器单元,PVDF 0.22 μm(Millipore Corp.,Billerica, MA);**Millex**®-GP注射器驱动过滤器单元,PES 0.22 μm;**Sterivex**® 0.22 μm过滤器单元(Millipore Corp.,Billerica,MA);和Vivaspin浓缩器(MWCO 10kDa,PES;MWCO 3kDa,PES)(Sartorius Corp.,Edgewood, NY)。为了制备本发明的低离子型蛋白制剂,对蛋白溶液(其可以在缓冲剂中溶解)进行DF/UF处理,其中用水作为DF/UF介质。在一个优选的实施方案中,DF/UF介质由水组成,且不包含任何其它赋形剂。

[0163] 在本发明的DF/UF处理中可以使用任意水,尽管优选的水是纯化水或去离子水。可以用于实现本发明的本领域已知的水的类型包括注射用水(WFI)(例如,HyPure WFI品质水(HyClone),AQUA-**NOVA**® WFI(Aqua Nova)),UltraPure™水(Invitrogen),和蒸馏水(Invitrogen;Sigma-Aldrich)。

[0164] 存在两种形式的DF/UF,包括间断式DF/UF和连续式DF/UF。本发明的方法可以根据任一种模式来实现。

[0165] 连续的DF/UF(也称作恒定体积DF/UF)包含,以与产生滤液相同的速率,向渗余物加入水或新的缓冲液,洗去渗余物(样品或第一蛋白溶液)中的起始缓冲盐(或其它低分子量物质)。结果,渗余物体积和产物浓度在DF/UF处理过程中不变。去除的盐的量与产生的滤液体积有关,与渗余物体积有关。产生的滤液体积通常称作“渗滤体积”。单次渗滤体积(DV)是当开始渗滤时渗余物的体积。对于连续渗滤,以与产生滤液相同的速率加入液体。当收集的滤液的体积等于起始渗余物体积时,已经处理完1DV。

[0166] 间断的DF/UF(下面在实施例部分提供了它的实例)包括2种不同的方法,间断的序贯DF/UF和体积减小间断的DF/UF。通过序贯稀释实现的间断DF/UF包含,首先用水稀释样品(或第一蛋白溶液)至预定的体积。然后通过UF将稀释后的样品浓缩回它的起始体积。通过体积减小实现的间断DF/UF包含,首先将样品浓缩至预定的体积,然后用水或替代缓冲液将样品稀释回它的起始体积。象连续DF/UF一样,重复该过程,直到除去不希望的溶质(例如,离子型赋形剂)的水平。

[0167] 使用水(例如,WFI)作为DF/UF介质,根据本领域已知的常规技术可以实现DF/UF(例如,Industrial Ultrafiltration Design and Application of Diafiltration Processes, Beaton&Klinkowski, J. Separ. Proc. Technol., 4(2) 1-10(1983))。商业上可得到的用于执行DF/UF的装置的实例包括Millipore Labscale™TFF系统(Millipore),LVCentramate™ Lab切向流系统(Pall Corporation),和UniFlux系统(GE Healthcare)。

[0168] 例如,在一个优选的实施方案中,使用具有500mL贮器的Millipore Labscale™切向流过滤(TFF)系统来实现本发明的方法,生产渗滤的抗体溶液。以间断方式执行DF/UF

程序,使用 14 个过程步骤来在水中生产高浓度抗体制剂。对于其它的示例性的装置、溶液和水体积、过程步骤的数目、和本发明特定实施方案的其它参数,参见下面的实施例部分。

[0169] 用于根据本发明的缓冲液交换(其中蛋白重配进水中)的渗滤的替代方法包括渗析和凝胶过滤,它们二者都是本领域技术人员已知的技术。渗析需要填充渗析袋(特定孔隙率的膜包装),将袋打结,并将袋置于水浴中。通过扩散,袋中的盐浓度与浴池中的盐浓度平衡,其中大分子(例如,不能扩散穿过袋的蛋白)保留在袋中。与袋中样品体积相比浴池的体积越大,可以达到的平衡浓度越低。一般而言,需要更换浴水,以彻底去除所有的盐。凝胶过滤是一种非吸附色谱技术,它基于分子大小来分离分子。在凝胶过滤中,通过尺寸排阻,可以将大分子(例如,蛋白)与更小的分子(例如,盐)分离。

[0170] 在本发明的一个优选的实施方案中,用水对第一蛋白溶液进行重复的体积交换,从而得到主要是水和蛋白的水制剂。根据溶液中的蛋白,渗滤步骤可以进行任意数目的次数,其中一个渗滤步骤等于一次总体积交换。在一个实施方案中,渗滤处理进行 1、2、3、4、5、6、7、8、9 次,或最高达认为从第一蛋白溶液去除赋形剂(例如,盐)必需的许多次,使得蛋白基本上溶于水。当已经加入渗余物侧的水的体积等于蛋白溶液的起始体积时,完成单轮或单步渗滤。

[0171] 在一个实施方案中,对蛋白溶液进行至少 2 个渗滤步骤。在一个实施方案中,用水进行的渗滤步骤或体积交换可以重复至少 4 次,优选至少 5 次。在一个实施方案中,对第一蛋白溶液进行水渗滤,直到达到至少 6 倍体积交换。在另一个实施方案中,对第一蛋白溶液进行水渗滤,直到达到至少 7 倍体积交换。在上述数字之间的范围,例如,4-6 或 5-7,也构成本发明的一部分。例如,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。

[0172] 在一个优选的实施方案中,应当使蛋白向超滤膜滤液侧的流失最小化。蛋白向特定膜滤液侧流失的风险,随着蛋白大小与膜孔径的相对关系和蛋白浓度而变化。随着蛋白浓度的增加,蛋白向滤液流失的风险增加。对于特定膜孔径,大小接近膜 MWCO 的更小的蛋白与更大的蛋白相比,蛋白流失的风险更大。因而,当对更小的蛋白进行 DF/UF 时,与使用相同膜对更大的蛋白进行 DF/UF 相比,在不发生不可接受的蛋白流失的情况下,不可能达到相同的体积减小。换言之,与使用相同装置和膜超滤更小蛋白的溶液相比,更大蛋白的溶液可以超滤至更小的体积,同时溶液达到更高的蛋白浓度。与更大的蛋白相比,对于更小的蛋白,使用特定孔径膜的 DF/UF 操作可能需要更多的处理步骤;更大的体积减小和更大蛋白的浓度允许加回更大体积的水,导致单个处理步骤的蛋白溶液中的剩余缓冲剂或赋形剂成分的更大稀释。因此,与更小的蛋白相比,对于更大的蛋白,达到溶质的某种减小可能需要更少的处理步骤。在给定蛋白大小和在操作使用的超滤装置孔径的情况下,本领域技术人员能够计算出每个处理步骤可行的浓度数量和达到溶质的某种减小所需的总处理步骤的数目。

[0173] 作为本发明的渗滤方法的结果,在主要包含水和蛋白的最终水制剂中,第一蛋白溶液中溶质的浓度显著减小。例如,水制剂可以具有这样的赋形剂终浓度,它比第一蛋白溶液小至少 95%,优选比第一蛋白溶液小至少 99%。例如,在一个实施方案中,将蛋白溶于 WFI 是建立理论最终赋形剂浓度的过程,这通过 5 个渗滤体积的恒定体积渗滤来达到,这等于或接近  $C_i e^{-5} = 0.00674$ ,即接近 99.3% 最大赋形剂减少。在一个实施方案中,在使用恒

定体积渗滤的商业 DF/UF 的最后步骤中,本领域技术人员可以进行 6 体积交换,即  $C_i$  是  $C_i e^{-6} = 0.0025$ 。这会提供约 99.75% 最大理论赋形剂减少。在另一个实施方案中,本领域技术人员可以使用 8 渗滤体积交换,以得到理论的 ~ 99.9% 最大赋形剂减少。

[0174] 术语“无赋形剂的”或“没有赋形剂”表示,制剂基本上没有赋形剂。在一个实施方案中,无赋形剂的表示没有缓冲剂、没有盐、没有糖、没有氨基酸、没有表面活性剂和/或没有多元醇。在一个实施方案中,术语“基本上没有赋形剂”表示,溶液或制剂是至少 99% 没有赋形剂。但是,应当理解,在某些实施方案中,制剂可以包含某些特定的非离子型赋形剂,例如,蔗糖或甘露醇,并且制剂否则仍然是无赋形剂的。例如,制剂可以包含水、蛋白和甘露醇,其中所述制剂否则是无赋形剂的。在另一个实例中,制剂可以包含水、蛋白和聚山梨醇酯 80,其中所述制剂否则是无赋形剂的。在另一个实例中,所述制剂可以包含水、蛋白、山梨醇和聚山梨醇酯 80,其中所述制剂否则是无赋形剂的。

[0175] 当根据本文所述的方法用水渗滤第一蛋白溶液时,离子型赋形剂会被洗出,结果,渗滤过的水制剂的电导率低于第一蛋白溶液。如果水溶液导电,则它必然含有离子,如用离子型赋形剂所发现的。低电导率度量因此指示着本发明的水制剂具有显著减少的赋形剂,包括离子型赋形剂。

[0176] 根据本领域已知的方法,测量溶液的电导率。电导率计量器和电导池可以用于测量水制剂的电导率,在使用前应当校正成标准溶液。本领域可得到的电导率计量器的实例包括 MYRON L Digital (Cole Parmer®), 电导计 (Metrohm AG), 和 Series 3105/3115 集成电导率分析仪 (Kemotron)。在一个实施方案中,水制剂具有小于 3mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,水制剂具有小于 2mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,水制剂具有小于 1mS/cm 的电导率。在本发明的一个方面,水制剂具有小于 0.5mS/cm 的电导率。在上述数字之间的范围,例如,1-3mS/cm,也意在被本发明所包含。例如,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和/或下限的数值范围。另外,落入所述数字内的值也包括在本发明中,例如,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0,1.1,1.2,1.3,1.4,1.5,1.6,1.7,1.8,1.9,2.0,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,2.7,2.8,2.9,3.0,依此类推。

[0177] 本发明的一个重要方面是,可以浓缩渗滤过的蛋白溶液(渗滤处理第一蛋白溶液后得到的溶液)。通过进行该处理,已经发现高浓度的蛋白在水中是稳定的。渗滤后的浓缩产生含有水和与第一蛋白溶液相比升高浓度的蛋白的水制剂。因而,本发明也包括,使用水作为渗滤介质渗滤蛋白溶液,和随后浓缩得到的水溶液。通过本领域已知的方式,包括离心,可以浓缩渗滤过的蛋白溶液。例如,渗滤后,对基于水的渗滤过的蛋白溶液进行离心处理,后者用于通过超滤将蛋白浓缩为高浓度制剂,同时维持基于水的溶液。通过离心用超滤膜和/或装置浓缩溶液的方式,是本领域已知的,例如,使用 Vivaspin 离心浓缩器 (Sartorius Corp. Edgewood, NY)。

[0178] 本发明的方法提供了在水中浓缩非常高水平的蛋白的方法,不需要额外的稳定剂。使用本发明的方法得到的水制剂中的蛋白的浓度,可以是根据希望的浓度的任意量。例如,根据本文所述方法制备的水溶液中的蛋白浓度是至少约 10  $\mu$ g/mL;至少约 1mg/mL;至少约 10mg/mL;至少约 20mg/mL;至少约 50mg/mL;至少约 75mg/mL;至少约 100mg/mL;至少约 125mg/mL;至少约 150mg/mL;至少约 175mg/mL;至少约 200mg/mL;至少约 220mg/mL;至少约 250mg/mL;至少约 300mg/mL;或大于约 300mg/mL。本发明也意在包括在上述浓度

之间的范围,例如,至少约 113mg/mL,至少约 214mg/mL,和至少约 300mg/mL。另外,意在包括使用任意上述值(或上述范围之间的值)的组合作为上限和/或下限的数值范围,例如,100-125mg/mL,113-125mg/mL,和 126-200mg/mL 或更多。

[0179] 本发明的方法提供了下述优点,即得到的制剂具有低百分比的蛋白聚集体,尽管蛋白水制剂的浓度较高。在一个实施方案中,包含水和高浓度的蛋白(例如,抗体)的水制剂含有小于约 5%蛋白聚集体,甚至在没有表面活性剂或其它类型赋形剂的情况下。在一个实施方案中,所述制剂包含不超过约 7.3%聚集体蛋白;所述制剂包含不超过约 5%聚集体蛋白;所述制剂包含不超过约 4%聚集体蛋白;所述制剂包含不超过约 3%聚集体蛋白;所述制剂包含不超过约 2%聚集体蛋白;或所述制剂包含不超过约 1%聚集体蛋白。在一个实施方案中,所述制剂包含至少约 92%、至少约 93%、至少约 94%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%或至少约 99%单体蛋白。在上述浓度之间的范围,例如,至少约 98.6%,不超过约 4.2%,也构成本发明的一部分。另外,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0180] 许多基于蛋白的药物产品需要在高浓度配制。例如,基于抗体的产品在它们的药物产品(DP)制剂中逐渐倾向于超过 100mg/mL,以达到适宜的功效率和满足最大~1mL注射体积的典型患者使用需求。因此,也在更高的浓度进行下游加工步骤,例如渗滤进最终的制剂缓冲液或超滤来增加蛋白浓度。

[0181] 经典的热力学预测,分子间相互作用可以影响小溶质的跨渗析膜分配,特别在更高的蛋白浓度时,可以得到描述非理想渗析平衡和分子间相互作用的效应的模型(Tanford Physical chemistry or macromolecules. New York, John Wiley and Sons, Inc., p182, 1961; Tester 和 Modell Thermodynamics and its applications, 第3版. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, 1997)。在不能得到应用这类模型所必需的过程开发环境的详细热力学数据的情况下,在商业 DF/UF 操作的设计中很少考虑分子间相互作用。结果,DP 赋形剂浓度可能显著不同于标注的浓度。公开了商业的和开发的产品的这种偏差的几个实例,例如,IL-1 受体拮抗剂中的氯化物比标注值低最高达 30%, PEG-sTNF 受体中的组氨酸比标注值低 40%, 融合缀合蛋白中的醋酸盐比标注值高最高达 200% (Stoner 等人, J. Pharm. Sci., 93, 2332-2342 (2004))。实际 DP 不同于蛋白渗滤进的缓冲液的组成存在几个原因,包括 Donnan 效应 (Tombs 和 Peacocke (1974) Oxford; Clarendon Press), 非特异性相互作用 (Arakawa 和 Timasheff, Arch. Biochem. Biophys., 224, 169-77 (1983); Timasheff, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 22, 67-97 (1993)), 和体积排阻效应。体积排阻包括大部分蛋白微分比容是 0.7-0.8mL/g。<sup>5</sup>因而,对于 100mg/mL 的球蛋白,蛋白分子占总溶液体积的约 7.5%。假定没有显著的分子间相互作用,这翻译成膜渗余物侧的溶质摩尔浓度是膜渗透物侧的摩尔浓度的 92.5%。这解释了为什么基本上所有的蛋白溶液组成在超滤处理过程中必然改变。例如,在 40mg/mL,蛋白分子占总溶液体积的约 3%,使浓度升高至 150mg/mL 的超滤步骤必然诱发赋形剂摩尔浓度改变超过 8% (150mg/mL 的蛋白占总溶液体积的超过 11%)。在上述百分比之间的范围也构成本发明的一部分。另外,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和/或下限的数值范围。

[0182] 根据本发明的方法和组合物,通过使用纯水作为渗滤介质,可以回避 DF/UF 操作过程中的缓冲液组成变化。通过浓缩蛋白比最后本体 (bulk) DS 中希望的浓度超过~20%,

可以随后加入赋形剂,例如,通过高度浓缩的赋形剂储液。然后可以确保赋形剂浓度和溶液 pH 与标注的一致。

[0183] 本发明的水制剂作为原料提供了一个优点,因为它基本上不含有赋形剂。可以精确地计算在水中渗滤后加入制剂中的任意赋形剂,即预先存在的赋形剂浓度不会干扰计算。药学上可接受的赋形剂的实例描述在 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版,Osol, A. Ed. (1980),其通过援引并入本文。因而,本发明的另一个方面包括,使用通过本文所述方法得到的水制剂制备制剂、尤其药物制剂,其具有已知浓度的赋形剂,包含非离子型赋形剂或离子型赋形剂。本发明的一个方面包括一个额外的步骤,其中将赋形剂加入包含水和蛋白的水制剂中。因而,本发明的方法提供了一种水制剂,其基本上没有赋形剂,且可以用作制备包含水、蛋白和特定浓度的赋形剂的制剂的原料。

[0184] 在一个实施方案中,本发明的方法可以用于将非离子型赋形剂(例如,糖)或非离子型表面活性剂(例如聚山梨醇酯和泊洛沙姆)添加到制剂中,而不改变特征,例如蛋白浓度、蛋白的流体动力学直径、电导率等。

[0185] 下面在部分 III 中描述了使用上述方法得到的水制剂的其它特征和优点。下面在实施例中也描述了执行本发明的方法的示范性规程。

[0186] III. 本发明的制剂

[0187] 本发明提供了包含蛋白和水的水制剂,其具有许多胜过本领域常规制剂的优点,包括蛋白在水中的稳定性、不需要额外的赋形剂,升高浓度的蛋白、不需要额外的赋形剂来维持蛋白溶解度,和低重量摩尔渗透压浓度。本发明的制剂也具有优良的储存性质,因为制剂中的蛋白在储存过程中保持稳定,例如在 7°C 或冷冻 / 融化条件下,甚至在高蛋白浓度和重复的冷冻 / 融化处理步骤下,以液体形式储存超过 3 个月。在一个实施方案中,本发明的制剂包含高浓度的蛋白,使得水制剂不显示出显著的乳色、聚集或沉淀。

[0188] 本发明的水制剂不依赖于标准的赋形剂,例如,张力调节剂,稳定剂,表面活性剂,抗氧化剂,冷冻保护剂,填充剂,冻干保护剂,碱性组分和酸性组分。在本发明的其它实施方案中,所述制剂含有水、一种或更多种蛋白,且没有离子型赋形剂(例如,盐,游离氨基酸)。

[0189] 在某些实施方案中,本发明的水制剂包含至少 50mg/mL 的蛋白浓度和水,其中所述制剂具有不超过 30mOsmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度。本发明也包括水制剂的重量摩尔渗透压浓度的更低限。在一个实施方案中,水制剂的重量摩尔渗透压浓度不超过 15mOsmol/kg。本发明的水制剂可以具有小于 30mOsmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度,且也具有高蛋白浓度,例如,蛋白浓度是至少 100mg/mL,且可以高达 200mg/mL 或更大。在上述浓度和重量摩尔渗透压浓度单元之间的范围也构成本发明的一部分。另外,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。

[0190] 本发明的水制剂的浓度不受蛋白大小的限制,所述制剂可以包括任意大小范围的蛋白。在本发明的范围内包括含有至少 50mg/mL 和高达 200mg/mL 或更多的蛋白的水制剂,其大小范围可以是 5kDa 至 150kDa 或更大。在一个实施方案中,本发明的制剂中的蛋白的大小是至少约 15kD,大小是至少约 20kD;大小是至少约 47kD;大小是至少约 60kD;大小是至少约 80kD;大小是至少约 100kD;大小是至少约 120kD;大小是至少约 140kD;大小是至少约 160kD;或大小是大于约 160kD。在上述大小之间的范围也构成本发明的一部分。另外,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。

[0191] 本发明的水制剂可以通过溶液中蛋白的流体动力学直径 ( $D_h$ ) 来表征。使用动态光散射 (DLS), 它是用于测定蛋白的  $D_h$  的确定的分析方法, 可以测量溶液中蛋白的流体动力学直径。单克隆抗体 (例如, IgG) 的典型值是约 10nm。低离子制剂, 如本文所述的那些, 其特征可能在于, 蛋白的  $D_h$  显著低于包含离子型赋形剂的蛋白制剂。已经发现, 使用纯水作为交换介质进行 DF/UF 处理制备的水制剂中的抗体的  $D_h$  值, 显著低于常规制剂中抗体的  $D_h$ , 且独立于蛋白浓度。在一个实施方案中, 本发明的水制剂中的抗体具有小于 4nm 或小于 3nm 的  $D_h$ 。

[0192] 在一个实施方案中, 水制剂中的蛋白的  $D_h$  小于缓冲溶液中的相同蛋白的  $D_h$ , 且与蛋白浓度无关。因而, 在某些实施方案中, 根据本文所述方法制备的水制剂中的蛋白的  $D_h$  比相同给定浓度下的缓冲溶液中的蛋白的  $D_h$  小至少 25%。缓冲溶液的实例包括、但不限于, 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在某些实施方案中, 本发明的水制剂中的蛋白的  $D_h$  比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小至少 50%, 比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小至少 60%, 比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小至少 70%, 或比给定浓度的 PBS 中的蛋白的  $D_h$  小超过 70%。在上述百分比之间的范围也构成本发明的一部分, 例如, 55%, 56%, 57%, 64%, 68%, 依此类推。另外, 意在包括使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围, 例如, 50% -80%。

[0193] 蛋白聚集是蛋白溶液的一个普遍问题, 经常由升高的蛋白浓度引起。本发明提供了实现高浓度的低蛋白聚集制剂的方法。本发明的制剂不依赖于缓冲系统和赋形剂 (包括表面活性剂) 来保持制剂中的蛋白可溶和免于聚集。本发明的制剂可以有利地用于治疗目的, 因为它们具有高蛋白浓度且是基于水的, 不依赖于其它试剂来达到溶液的高的、稳定的蛋白浓度。

[0194] 大多数生物产品 (包括抗体) 会发生许多降解过程, 后者经常源自溶液中的非酶反应。这些反应可能对产品稳定性、安全性和功效具有长期影响。通过在零下温度储存产品, 可以延迟这些不稳定性 (如果不能消除的话), 从而使生产商在供应的灵活性和可用性方面获得超过产品生存周期的巨大好处。尽管冷冻经常是最安全的且最可靠的生物产品储存方法, 它具有固有的风险。当水结晶时, 经由通过引入冰 - 液界面, 和通过溶质的冷冻浓缩 (低温浓缩), 的冷变性冷冻可以诱发蛋白应激。

[0195] 低温浓缩是这样的一个过程, 其中在冷冻过程中形成扁平的、不受控制的移动的冰锋, 它排除溶质分子 (小分子例如蔗糖、盐和蛋白制剂中常用的其它赋形剂, 或大分子例如蛋白), 在其它溶质以可能潜在导致局部的 pH 或离子浓度极端的浓度存在时, 产生其中蛋白可能以相对的高浓度存在的区域。对于大多数蛋白, 这些条件可以导致变性, 在有些情况下, 导致蛋白和溶质沉淀。由于缓冲盐和其它溶质在这样的条件下也被浓缩, 这些组分可能达到足够高的浓度, 导致在冷冻块内的区域中的 pH 和 / 或还原 - 氧化变化。作为冷冻过程中溶液中缓冲盐结晶 (例如, 磷酸盐) 的结果而观察到的 pH 变化可以跨几个 pH 单位, 这可能影响蛋白稳定性。

[0196] 浓缩的溶质也可以导致冰点降低到溶质可能根本不结冰的程度, 在这些不利条件下, 蛋白存在于溶液中。经常, 可能应用快速冷却来缩短将蛋白暴露于这些不希望的条件下的时间段。但是, 快速冷冻可以诱发大面积的冰 - 水界面, 而慢速冷却诱发更小的界面面积。例如, 证实了在一个冷冻 / 融化步骤中快速冷却 6 种模型蛋白会产生大于 10 个慢速冷却循环的变性作用, 这证明了疏水冰表面诱发的变性的巨大去稳定化潜力。

[0197] 本发明的水制剂具有优秀的稳定性和储存性质。水制剂的稳定性不依赖于储存形式,包括、但不限于,被冷冻、低压冻干或喷雾干燥的制剂。可以在选定的温度测量稳定性选定的时间段。在本发明的一个方面,水制剂中的蛋白在液体形式稳定至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 12 个月。在上述时间段之间的范围也构成本发明的一部分,例如,9 个月,依此类推。另外,意在包括使用任意上述值的组合作为上限和 / 或下限的数值范围。优选地,所述制剂在室温(约 30°C)或 40°C 稳定至少 1 个月,和 / 或在约 2-8°C 稳定至少 1 年,或更优选在约 2-8°C 稳定至少 2 年。此外,在冷冻(至例如 -80°C)和融化制剂(在下文中称作“冷冻 / 融化循环”)后,制剂优选是稳定的。

[0198] 蛋白的稳定性也可以定义为保持生物活性的能力。如果药物制剂中的蛋白在施用给受试者后是生物活性的,则药物制剂中的蛋白“保持它的生物活性”。例如,如果药物制剂中抗体的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的约 30%、约 20% 或约 10% 内(在测定误差内)(例如,通过抗原结合试验来测定),则抗体的生物活性被保持。

[0199] 水制剂中蛋白的稳定性也可以定义为制剂中蛋白的单体、聚集体或片段的百分比或其组合。如果肉眼检查颜色和 / 或澄清度后或通过紫外光散射或通过尺寸排阻色谱测量表明基本上没有聚集、沉淀和 / 或变性的迹象,则制剂中蛋白“保持它的物理稳定性”。在本发明的一个方面,稳定的水制剂是这样的制剂,其具有小于约 10%、优选小于约 5% 的蛋白作为制剂中的聚集体存在。

[0200] 本发明的水制剂的另一个特征是,在有些情况下,使用水渗滤蛋白会产生与第一蛋白溶液相比具有改善的粘度特征的水制剂(即,渗滤过的蛋白溶液的粘度比第一蛋白溶液降低)。本领域技术人员会认识到,用于测量粘度的多种方法可以用于本发明的不同实施方案中制备制剂。例如,使用毛细管可以产生运动学粘度数据(cSt)。在其它实施方案中,单独地或与其它粘度数据一起,陈述动力学粘度数据。通过将运动学粘度数据乘以密度,可以产生动力学粘度数据。

[0201] 在一个实施方案中,本发明也提供了通过加入非离子型赋形剂例如甘露醇,不改变其它希望的特征例如非乳色,调节某些特征例如重量摩尔渗透压浓度和 / 或粘度的方法,如在高蛋白浓度 - 水溶液中所希望的。这样,在本发明的范围内包括基于水的、且具有高蛋白浓度的制剂,其中在蛋白向水转移过程中或之后,或在渗滤过程中,加入改善例如制剂的重量摩尔渗透压浓度或粘度特征的赋形剂。因而,在本发明的范围内也包括,在蛋白转移进最终的低离子型制剂的过程中,加入这样的非离子型赋形剂。可以加入本发明的水制剂用于改变制剂的目标特征的非可离子化赋形剂的实例包括、但不限于,甘露醇,山梨醇,非离子型表面活性剂(例如,聚山梨醇酯 20,聚山梨醇酯 40,聚山梨醇酯 60 或聚山梨醇酯 80),蔗糖,海藻糖,棉子糖,和麦芽糖。

[0202] 本文的制剂也可以含有超过一种蛋白。关于药物制剂,根据待治疗的具体适应症的需要,可以加入额外的不同的蛋白,优选具有不会不利地影响其它蛋白的补充活性的那些。例如,可能希望在单一制剂中提供 2 种或更多种结合 TNF 或 IL-12 的抗体。此外,可以在一个制剂中组合抗 -TNF 或抗 -IL12 抗体。这样的蛋白合适地以对于预期目的有效的量组合存在。

[0203] 可以包含在水制剂中的蛋白的实例包括抗体或其抗原结合片段。可以用于本发明中的不同类型的抗体或其抗原结合片段的实例包括、但不限于,嵌合抗体,人抗体,人化

抗体,和结构域抗体(dAb)。在一个实施方案中,用于本发明的方法和组合物中的抗体是抗-TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分或抗-IL-12 抗体或其抗原结合部分。可以用于本发明中的抗体或其抗原结合片段的其它实例包括、但不限于,1D4.7(抗-IL-12/抗-IL-23;Abbott Laboratories),2.5(E)mg1(抗-IL-18;Abbott Laboratories),13C5.5(抗-IL-13;Abbott Laboratories),J695(抗-IL-12;Abbott Laboratories),阿非莫单抗(Fab 2 抗-TNF;Abbott Laboratories),Humira(阿达木单抗(D2E7);Abbott Laboratories),Campath(阿仑单抗),CEA-Scan 阿西莫单抗(fab 片段),Erbitux(西妥昔单抗),Herceptin(曲妥单抗),Myoscint(戊酸印西洛马),ProstaScint(卡罗单抗喷地肽),Remicade(英夫利昔单抗),ReoPro(阿昔单抗),Rituxan(利妥昔单抗),Simulect(巴利昔单抗),Synagis(帕利珠单抗),Verluma(若莫单抗),Xolair(Omalizumab),Zenapax(达珠单抗),Zevalin(替伊莫单抗),Orthoclone OKT3(莫罗单抗-CD3),Panorex(依决洛单抗),和 MyIotarg(吉姆单抗奥佐米星) golimumab(Centocor), Cimzia(Certolizumab pegol), Soliris(Eculizumab),CNT01275(ustekinumab),Vectibix(panitumumab),Bexxar(托西莫单抗和 I<sup>131</sup>托西莫单抗) 和 Avastin(贝伐单抗)。

[0204] 在一个替代方案中,蛋白是治疗蛋白,包括,但不限于,阿法链道酶(链道酶 $\alpha$ ), Regranex(贝卡普勒明), Activase(阿替普酶), Aldurazyme(Laronidase), Amevive(Alefcept), Aranesp(Darbepoetin $\alpha$ ), 贝卡普勒明浓缩剂, Betaseron(干扰素 $\beta$ -1b), BOTOX(A 型肉毒毒素), Elitek(拉布立酶), Elspar(门冬酰胺酶), Epogen(阿法依伯汀), Enbrel(依那西普), Fabrazyme(Agalsidase $\beta$ ), 干复津(干扰素 $\alpha$ -1), 干扰能(干扰素 $\alpha$ -2a), Kineret(阿那白滞素), MYOBLOC(B 型肉毒毒素), Neulasta(Pegfilgrastim), Neumega(奥普瑞白介素), 优保津(非格司亭), Ontak(地尼白介素-毒素连接物), PEGASYS(Peginterferon $\alpha$ -2a), Proleukin(阿地白介素), 阿法链道酶(链道酶 $\alpha$ ), Rebif(干扰素 $\beta$ -1a), Regranex(贝卡普勒明), Retavase(瑞替普酶), Roferon-A(干扰素 $\alpha$ -2), TNKase(替奈普酶), 和 Xigris(Drotrecogin $\alpha$ ), Arcalyst(Riloncept), NPlate(Romiplostim), Mircera(甲氧基聚乙二醇-红细胞生成素 $\beta$ ), Cinryze(C1 酯酶抑制剂), Elaprase(idursulfase), Myozyme(alglucosidase $\alpha$ ), Orencia(abatacept), Naglazyme(galsulfase), Kepivance(palifermin) 和 Actimmune(干扰素 $\gamma$ -1b)。

[0205] 可以包含在本文所述的方法和组合物中的蛋白的其它实例包括,哺乳动物蛋白,包括其重组蛋白,例如,生长激素,包括人生长激素和牛生长激素;生长激素释放因子;甲状旁腺激素;甲状腺刺激激素;脂蛋白; $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶;胰岛素 A-链;胰岛素 B-链;胰岛素原;促卵泡激素;降钙素;黄体化激素;胰高血糖素;凝固因子例如因子 VIIIc, 因子 IX, 组织因子, 和 von Willebrands 因子;抗-凝固因子例如蛋白 C;心房钠尿因子;肺表面活性剂;纤维蛋白溶酶原激活剂,例如尿激酶或组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(t-PA); bombazine;凝血酶;肿瘤坏死因子- $\alpha$  和 - $\beta$  脑啡肽酶; RANTES(激活后受调节,通常由 T-细胞表达和分泌);人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1- $\alpha$ );血清白蛋白例如人血清白蛋白;苗勒氏抑制物质;松弛素 A-链;松弛素 B-链;松弛素原;小鼠促性腺素-相关肽;DNA 酶;抑制素;激活素;血管内皮生长因子(VEGF);激素或生长因子的受体;整联蛋白;蛋白 A 或 D;类风湿因子;神经营养因子例如骨-衍生的神经营养因子(BDNF),神经营养因子-3, -4, -5 或 -6(NT-3, NT4, NT-5 或 NT-6) 或神经生长因子例如 NGF- $\beta$ ;血小板-衍生的生长因子

(PDGF) ;成纤维细胞生长因子例如 aFGF 和 bFGF ;表皮生长因子 (EGF) ;转化生长因子 (TGF) 例如 TGF- $\alpha$  和 TGF- $\beta$  ,包括 TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2, TGF- $\beta$  3, TGF- $\beta$  4 或 TGF- $\beta$  5 ;胰岛素 - 样生长因子 -I 和 -II (IGF-I 和 IGF-II) ;des(1-3)-IGF-I ( 脑 IGF-I) ;胰岛素 - 样生长因子结合蛋白 ;CD 蛋白例如 CD3, CD4, CD8, CD19 和 CD20 ;促红细胞生成素 (EPO) ;血小板生成素 (TPO) ;骨诱导因子 ;免疫毒素 ;骨形态发生蛋白 (BMP) ;干扰素例如干扰素 - $\alpha$  , - $\beta$  , 和 - $\gamma$  ;集落刺激因子 (CSFs) , 例如, M-CSF, GM-CSF, 和 G-CSF ;白细胞介素 (ILs) , 例如, IL-1 至 IL-10 ;超氧化物歧化酶 ;T- 细胞受体 ;表面膜蛋白 ;衰变加速因子 (DAF) ;病毒抗原例如 AIDS 外膜的部分 ;运输蛋白 ;归巢受体 ;地址素 ;调节蛋白 ;免疫粘合物 ;抗体 ;和任意上面列出的多肽的生物活性片段或变体。

[0206] IV. 本发明的用途

[0207] 本发明的制剂可以治疗性地 ( 即体内 ) 使用, 或作为试剂用于体外或原位目的。

[0208] 治疗用途

[0209] 本发明的方法也可以用于制备基于水的制剂, 其具有对于治疗用途有益的特征。水制剂可以用作药物制剂来治疗受试者的病症。

[0210] 本发明的制剂可以用于治疗治疗蛋白适合治疗的任意病症。" 病症 " 是能够从蛋白治疗受益的任意状况。这包括慢性和急性病症或疾病, 包括使哺乳动物易感染所讨论病症的那些病理学状况。在抗 -TNF $\alpha$  抗体的情况下, 可以施用治疗有效量的抗体来治疗自身免疫性疾病, 例如类风湿关节炎, 肠病, 例如克罗恩病, 脊椎关节病, 例如强直性脊柱炎或皮肤病症, 例如银屑病。在抗 -IL-12 抗体的情况下, 可以施用治疗有效量的抗体来治疗神经障碍, 例如多发性硬化或皮肤病症, 例如银屑病。本发明的制剂可以用于治疗的病症的其它实例包括癌症, 包括乳腺癌, 白血病, 淋巴瘤, 和结肠癌。

[0211] 术语 " 受试者 " 意在包括活的生物体, 例如, 原核生物和真核生物。受试者的实例包括哺乳动物, 例如, 人, 狗, 牛, 马, 猪, 绵羊, 山羊, 猫, 小鼠, 兔子, 大鼠, 和转基因的非人动物。在本发明的具体实施方案中, 受试者是人。

[0212] 术语 " 治疗 " 是指治疗性处理和预防性的或阻止性的措施。需要治疗的个体包括已经患有病症的个体以及要预防病症的个体。

[0213] 根据已知的给药方法, 可以将水制剂施用给需要治疗的哺乳动物, 包括人。给药方法的实例包括, 静脉内给药, 例如推注或通过连续输注一段时间, 肌肉内的、腹膜内的、intracerebrospinal、皮下的、关节内的、滑膜内的、鞘内的、皮内的、透过皮肤的、口服的、局部的或吸入的给药。

[0214] 在一个实施方案中, 通过皮下给药, 将水制剂施用给哺乳动物。对于这样的目的, 可使用以下注射制剂 : 注射器, 以及其它装置, 包括注射装置 ( 例如, Inject-ease 和 Genject 装置 )、注射笔 ( 例如 GenPen)、无针装置 ( 例如, Medijector 和 Biojectorr 2000) 和皮下贴剂递送系统。在一个实施方案中, 所述装置, 例如注射器、自动注射笔, 含有大小规格范围为 25G 或直径更小的针头。在一个实施方案中, 针头大小规格范围从 25G 至 33G ( 包括介于之间的范围, 例如, 25sG, 26, 26sG, 27G, 28G, 29G, 30G, 31G, 32G, 和 33G)。在一个优选的实施方案中, 根据制剂的粘度特征和用于递送本发明的制剂的装置, 选择最小的针头直径和适宜的长度。

[0215] 本发明的方法 / 组合物的一个优点是, 它们会在溶液中提供高蛋白浓度, 这

对于使用无针装置将蛋白施用给受试者而言可能是理想的。这样的装置允许将蛋白分散在受试者的组织中,不需要通过针头注射。无针装置的实例包括、但不限于, Biojectorr 2000 (Bioject Medical Technologies), Cool.Click (Bioject Medical Technologies), Iject (Bioject Medical Technologies), Vitajet 3, (Bioject Medical Technologies), Mhi500 (The Medical House PLC), Injex 30 (INJEX-Equidyne Systems), Injex 50 (INJEX-Equidyne Systems), Injex 100 (INJEX-Equidyne Systems), Jet Syringe (INJEX-Equidyne Systems), Jetinjector (Becton-Dickinson), J-Tip (National Medical Devices, Inc.), Medi-Jector VISION (Antares Pharma), MED-JET (MIT Canada, Inc.), DermoJet (Akra Dermojet), Sonoprep (Sontra Medical Corp.), PenJet (PenJet Corp.), MicroPor (Altea Therapeutics), Zeneo (Crossject Medical Technology), Mini-Ject (Valeritas Inc.), Implaject (Caretex Medical LTD), Intraject (Aradigm), 和 Serojet (Bioject Medical Technologies)。

[0216] 本发明也包括容纳水制剂的递送装置。这样的装置的实例包括、但不限于, 注射器, 笔 (例如自动注射笔), 植入物, 吸入装置, 无针装置, 和贴剂。自动注射笔的一个实例描述在 2007 年 6 月 29 日提交的美国申请号 11/824516 中。

[0217] 本发明也包括递送本发明的制剂的方法, 其中通过吸入和含有用于所述递送的所述制剂的吸入装置。在一个实施方案中, 使用喷雾器或液体吸入器, 通过吸入, 将水制剂施用给受试者。一般而言, 喷雾器使用压缩空气来递送药物, 作为湿气雾剂或雾吸入, 所以, 需要药物可溶于水。喷雾器的类型包括喷射喷雾器 (空气喷射喷雾器和液体-喷射喷雾器) 和超声喷雾器。

[0218] 喷雾器的实例包括 Akita™ (Activaero GmbH) (参见 US2001037806, EP1258264)。Akita™ 是一种基于 Pari's LC Star 的台式喷雾器吸入系统 (Wt :7.5kg, BxWxH :260x 170x 270), 它为患者的呼吸型式提供完全控制。该装置可以以非常高的递送速率在小于 10min 内递送多达 500mg 在溶液中的药物到肺和肺周围。65% 的雾化颗粒小于 5 微米, 在 1.8bar 时的总气体动力学中位数直径 (MMAD) 是 3.8 微米。最低填充体积是 2mL, 最大体积是 8mL。吸入流速 (200mL/sec) 和喷雾器压力 (0.3-1.8bar) 由智能卡设定。该装置可以在肺功能试验的基础上针对每个患者单独调节。

[0219] 可以与本发明的组合物一起使用的喷雾器的另一个实例包括 **Aeroneb® Go/Pro/Lab** 喷雾器 (AeroGen)。**Aeroneb®** 喷雾器是基于 OnQ™ 技术, 即包含独特的圆顶状孔板的电子微量泵 (直径 3/8 英寸, 极薄), 所述孔板含有超过 1,000 个精密形成的锥形孔, 其周围环绕震动元件。**Aeroneb® Go** 是家用的移动式设备, 而 **Aeroneb® Pro** 是可重复使用的且可高压灭菌的用于医院和流动门诊的装置, **Aeroneb® Lab** 是用于临床前气雾剂研究和吸入研究的装置。所述系统的特征包括, 气雾剂微滴大小的优化和定制; 精确控制的微滴大小的低速气雾剂递送, 辅助呼吸系统内的靶向药物递送; 给药的灵活性; 适应定制的单次剂量安瓿, 后者含有在溶液或悬浮液中的固定体积的药物或用于普通目的喷雾器的可商业得到的溶液; 连续的、呼吸激活的或可编程的; 和能适应广范围患者的需要, 包括儿童和老年人; 单个或多个患者使用。

[0220] Aerocurrent™(AerovertRx corp)也可以与本发明的组合物一起使用(参见W02006006963)。该喷雾器是便携的、振动网眼喷雾器,其特征在于一次性的、预充的或用户填充的药盒。

[0221] Staccato™(Alexza Pharma)也可以与本发明的组合物一起使用(参见W003095012)。Staccato™技术的关键是,不热降解地蒸发药物,这通过快速加热药物薄膜来实现。在小于半秒内,将药物加热至足以将固体药物膜转化成蒸汽的温度。吸入器由3个核心组件组成:加热基质,覆盖在基质上的药物薄膜,和患者吸入的气道。吸入器是呼吸启动的,最大递送剂量是20-25mg,MMAD是在1-2微米范围内。

[0222] **AERx**®(Aradigm)也可以与本发明的组合物一起使用(参见W09848873, US5469750, US5509404, US5522385, US5694919, US5735263, US5855564)。**AERx**®是一种手持式电池启动的装置,它使用活塞机械装置来从**AERx**®通道排出制剂。该装置监视患者吸入气流,仅在达到最佳呼吸型式时发射。该装置可以递送约60%的剂量作为发射剂量,50-70%的发射剂量进入深肺,个体之间的差异性<25%。

[0223] 也可以与本发明的组合物一起使用的喷雾器装置的另一个实例包括**Respimat**®(Boehringer)。**Respimat**®是一种多剂量贮存系统,它通过扭动装置底来启动,后者被一个弹簧压缩,并将计量体积的制剂从药盒转移至给药腔。当开动该装置时,弹簧被释放,它迫使微型活塞进入给药腔,推动溶液穿过uniblock;所述uniblock由具有2个细出口喷嘴通道的过滤器结构组成。由**Respimat**®产生的MMAD是2um,该装置适合传统上用于治疗呼吸道病症的低剂量药物。

[0224] 本发明的组合物也可以使用Collegium Nebulizer™(Collegium Pharma)来递送,后者是包含储存在膜上的药物的喷雾器系统。在用重配溶剂重配后,使用Collegium Nebulizer,通过口或鼻吸入,将剂型施用给患者。

[0225] 也可以与本发明的组合物一起使用的喷雾器装置的另一个实例包括**Inspiration**® 626(Respironics)。所述626是一种用于家庭护理的基于压缩机的喷雾器。所述626会递送大小为0.5至5微米的颗粒。

[0226] 可以与本发明的组合物一起使用的喷雾器可以包括Adaptive Aerosol **Delivery**®技术(Respironics),它递送精确的且可再现的吸入药物剂量给患者,无论所述患者的年龄、尺寸或呼吸型式的差异。**AAD**®系统在机头中整合了电子设备和传感器,通过检测吸气和呼气过程中的压力变化,监视患者的呼吸型式。传感器决定在吸气的第一部分过程中何时脉冲气雾递送药物。在整个治疗过程中,传感器监视前面的3次呼吸,并适应患者的吸气和呼气型式。因为**AAD**®系统仅仅在患者通过口罩呼吸时递送药物,这些装置允许患者在治疗中呼吸,不会浪费药物。**AAD**®系统喷雾器的实例包括**HaloLite**® **AAD**®, **ProDose**® **AAD**®,和**I-Neb**® **AAD**®。

[0227] **HaloLite**<sup>®</sup> Adaptive Aerosol Delivery (**AAD**)<sup>®</sup> (Respironics) 是一种由便携压缩机提供动力的气动气雾化系统。**AAD**<sup>®</sup> 技术监视患者的呼吸型式 (通常每隔 10 毫秒), 根据使用的系统, 释放气雾化的药物脉冲进入吸入的特定部分, 或计算吸入过程中从“静置气雾剂云”抽吸的剂量 (参见 EP 0910421, 其通过援引并入本文)。

[0228] ProDos **AAD**<sup>®</sup> (Respironics) 是一种受“ProDose Disc<sup>™</sup>”系统 (Respironics) 控制的喷雾系统。ProDos **AAD**<sup>®</sup> 是一种由便携压缩机提供动力的气动气雾化系统, 其中要递送的剂量受到插入系统中的含有微芯片的盘所控制, 后者除了其它以外, 指示系统要递送的剂量。ProDose Disc<sup>™</sup> 是一种含有微芯片的塑料盘, 它插入在 ProDose **AAD**<sup>®</sup> 系统中, 并指示它递送什么剂量、给药次数、什么可以与各种控制数据一起递送, 包括药物批次编码和失效期 (参见 EP 1245244, 其通过援引并入本文)。通过 ProDose **AAD**<sup>®</sup> 可以递送 **Promixin**<sup>®</sup>, 用于治疗铜绿假单胞菌肺感染, 尤其囊性纤维化病。**Promixin**<sup>®</sup> 作为喷雾粉未来供给, 在使用前重配。

[0229] I-neb **AAD**<sup>®</sup> 是一种手持式 **AAD**<sup>®</sup> 系统, 它递送精确的且可再现的药物剂量进入患者的呼吸型式, 不需要单独的压缩机 (“I-Neb”)。I-neb **AAD**<sup>®</sup> 是小型化的 **AAD**<sup>®</sup> 吸入器, 其基于基于电子网的气雾化技术 (Omron) 和 **AAD**<sup>®</sup> 技术的组合来控制进入患者的呼吸型式的给药。该系统接近移动电话的大小, 重量小于 8 盎司。I-neb **AAD**<sup>®</sup> 已经用于递送 **Ventavis**<sup>®</sup> (iloprost) (CoTherix/Schering AG)。

[0230] 可以与本发明的组合物一起使用的喷雾器的另一个实例是 **Aria**<sup>™</sup> (Chrysalis)。Aria 是基于毛细管气雾剂产生系统。通过将药物制剂泵通过小的电加热毛细管, 形成气雾剂。排出毛细管后, 所述制剂被环境空气快速冷却, 形成 MMAD 范围为 0.5-2.0 $\mu$ m 的气雾剂。

[0231] 另外, 可以使用 TouchSpray<sup>™</sup> 喷雾器 (Odem) 来递送本发明的组合物。TouchSpray<sup>™</sup> 喷雾器是一种手持装置, 它使用穿孔的膜来产生气雾剂云, 所述膜在超声频率振动, 与贮液接触。振动作用从膜中的孔抽取流体喷射流, 将喷射流打碎成药物云。微滴的大小受到孔的形状 / 大小以及药物溶液的表面化学和组成的控制。已经报道, 该装置会递送 83% 的计量剂量到深肺。TouchSpray<sup>™</sup> 喷雾器的细节描述在美国专利号 6659364, 其通过援引并入本文。

[0232] 可以与本发明的组合物一起使用的其它喷雾器包括这样的便携式喷雾器, 其使用 2 个单向阀门, 当患者吸气时, 使气雾剂输出最大化, 且当患者呼气时, 使气雾剂输出最小化 (参见 PARI 喷雾器 (PARI GmbH)。挡板允许最佳大小的颗粒离开喷雾器。结果是高百分比的在可吸入范围内的颗粒, 这导致改善的向肺的药物递送。可以设计用于特定的患者群体的这样的喷雾器, 这样的患者小于 3 岁 (PARI BABY<sup>™</sup>) 和用于老年患者的喷雾器 (**PARI LC PLUS**<sup>®</sup> 和 **PARI LC STAR**<sup>®</sup>)。

[0233] 可以与本发明的组合物一起使用的其它喷雾器是 **e-Flow**<sup>®</sup> 喷雾器 (PARI GmbH),

它使用振动膜技术来气雾化药物溶液以及悬浮液或胶体分散系 (TouchSpray™; ODEM (英国))。e-Flow® 喷雾器能处理 0.5ml 至 5ml 流体体积, 且生成的气雾剂含有非常高密度的活性药物、精确限定的微滴大小, 和在尽可能最短的时间内递送高比例的可吸入微滴。已经使用 e-Flow® 喷雾器递送的药物包括氨曲南和利多卡因。关于 e-Flow® 喷雾器的其它细节描述在 US 6962151, 其通过援引并入本文。

[0234] 可以与本发明的组合物一起使用的其它喷雾器包括 Microair® 电子喷雾器 (Omron) 和 Mystic™ 喷雾器 (Ventaira)。Microair® 喷雾器非常小, 使用振动网技术来有效地递送溶液药物。Microair 装置具有 7mL 容量, 生成 MMAD 大小约 5 微米的药物颗粒。关于 Microair® 喷雾器的其它细节, 参见美国专利公开号 2004045547, 其通过援引并入本文。Mystic™ 喷雾器使用强电场来将液体破碎成接近单分散的带电的颗粒的喷雾。Mystic™ 系统包括保留单元、剂量计量系统、气雾产生喷嘴、和电压转换器, 它们一起提供多剂量或单位剂量递送选择。Mystic™ 装置会被呼吸激活, 且已经与 Corus 1030™ (利多卡因盐酸盐), Resmycin® (多柔比星盐酸盐), Acuair (丙酸氟替卡松), ViroPharm 的 NCE, 和 Pfizer 的 NCE 一起使用。关于 Mystic™ 喷雾器的其它细节, 可以参见美国专利号 6397838, 其通过援引并入本文。

[0235] 用于本发明的制剂的肺递送的其它方法, 提供在美国申请号 12/217, 972, 其通过援引并入本文。

[0236] 蛋白的适当剂量 (“治疗有效量”) 取决于, 例如, 要治疗的状况、状况的严重性和进程、施用的蛋白用于预防性还是治疗性目的、以前的治疗、患者的临床历史和对蛋白的响应、使用的蛋白的类型、和主治医师的考虑。蛋白适合一次或经一系列治疗施用给患者, 且可以在诊断前的任意时间施用给患者。蛋白可以作为单独治疗或与可用于治疗所讨论状况的其它药物或疗法联合地施用。

[0237] 本发明的制剂克服了经常伴随高浓度蛋白的常见的蛋白聚集问题, 因此, 提供了可以将高水平的治疗蛋白施用给患者的新方法。本发明的高浓度制剂在给药中提供了一个优点, 使用等于或小于标准治疗制剂的体积, 可以将更高的剂量施用给受试者。在蛋白的生产商提供的标签上, 描述了治疗蛋白的标准治疗。例如, 根据生产商提供的标签, 通过重配低压冻干蛋白至 10mg/mL 的浓度, 施用英夫利昔单抗来治疗类风湿关节炎。本发明的制剂可以包含高浓度的英夫利昔单抗, 其中高浓度包括比标准的 10mg/mL 更高的浓度。在另一个实例中, 根据生产商提供的标签, 通过重配低压冻干蛋白至 125mg/mL 的浓度, 施用 Xolair (omalizumab) 来治疗哮喘。在该情况下, 本发明的高浓度制剂包括浓度大于标准的 125mg/mL 的抗体 omalizumab。

[0238] 因而, 在一个实施方案中, 本发明的制剂包含高浓度, 它比已知的标准制剂中的治疗蛋白的浓度大至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 100%、至少约 110%、至少约 120%、至少约 130%、至少约 140%、至少约 150%、至少约 175%、至少约 200%、至少约 225%、至少约 250%、至少约 275%、至少约 300%、至少约 325%、至少约 350%、至少约 375%、至少

约 400%，依此类推。

[0239] 在另一个实施方案中，本发明的制剂包含高浓度，它是已知的标准制剂中的治疗蛋白的浓度的至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、至少约 6 倍、至少约 7 倍、至少约 8 倍、至少约 9 倍、至少约 10 倍，依此类推。

[0240] 可以为治疗用途改善水制剂的特征。例如，通过使用无赋形剂的水作为渗滤介质，对抗体蛋白溶液进行渗滤，可以改善抗体制剂的粘度。如上面在部分 II 中所述，可以将赋形剂（例如改善粘度的那些）加回水制剂，使得赋形剂的终浓度是已知的，且为指定的用途改善制剂的特定特征。例如，本领域技术人员会认识到，希望的药物制剂粘度取决于递送制剂的模式，例如，注射、吸入、皮吸收，依此类推。通常，希望的粘度会平衡接受制剂的受试者的舒适性和具有治疗效应所需的制剂中的蛋白剂量。例如，注射制剂的普遍可接受水平的粘度是小于约 100mPas、优选小于 75mPas、甚至更优选小于 50mPas 的粘度水平。这样，水制剂的粘度可以是治疗用途可接受的，或可能需要加入赋形剂来改善希望的特征。

[0241] 在一个实施方案中，本发明提供了包含水和人 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合部分的水制剂，其中所述制剂不含有赋形剂，其中所述制剂具有使它有利地用作治疗剂的粘度，例如，当蛋白浓度是约 175mg/mL 时，在 8°C 小于 40cP 和在 25°C 小于 25cP 的低粘度。在一个实施方案中，具有改善的粘度的制剂中的抗体或其抗原结合部分的浓度是至少约 50mg/mL。在一个实施方案中，本发明的制剂具有约 1 至约 2mPas 的粘度。

[0242] 非治疗用途

[0243] 本发明的水制剂也可以用于非治疗用途，即体外目的。

[0244] 本文所述的水制剂可以用于医学和生物技术中的诊断或实验方法，包括，但不限于，用于基因组学、蛋白组学、生物信息学、细胞培养、植物生物学和细胞生物学。例如，本文所述的水制剂可以用于提供在标记和检测方法中作为分子探针需要的蛋白。本文所述的制剂的其它用途是，提供细胞培养试剂的添加剂，包括用于生产目的的细胞生长和蛋白生产。

[0245] 本文所述的水制剂可以用于不太关心制剂中的赋形剂可能如何与实验环境起作用（例如，干扰在实验中使用的另一种试剂）的实验中。在另一个实例中，含有高浓度蛋白的水制剂可以用作实验室用途的试剂。这样的高浓度形式的蛋白会扩展实验室实验的现有限制。

[0246] 本发明的制剂的另一个替代用途是，提供食物产品的添加剂。因为本发明的水制剂主要由水和蛋白组成，所述制剂可以用于递送高浓度的目标蛋白（例如营养补充剂）给食物。本发明的水制剂提供了蛋白在水中的高浓度，不需要关心稳定性 / 溶解度所需的赋形剂，后者可能不适合人消耗。例如，乳清 - 和大豆 - 衍生的蛋白会带给食物多样性，因为这些蛋白具有模仿脂肪的口感和质地的能力。这样，乳清 - 和大豆 - 衍生的蛋白可以添加到食物中降低总脂肪含量，而不牺牲满意度。因而，可以配制包含合适量的乳清 - 和大豆 - 衍生的蛋白的水制剂，并用于补充食物产品。

[0247] 生产的产品

[0248] 在本发明的另一个实施方案中，提供了含有本发明的水制剂的产品，并提供了关于它的用途的说明书。生产的产品包含容器。合适的容器包括，例如，瓶子，管形瓶（例如，双室瓶），注射器（例如双室注射器），含有注射器的自动注射笔，和试管。所述容器可以由多种材料制成，例如玻璃、塑料或聚碳酸酯。所述容器容纳水制剂，并贴有或伴有标签，

容器可以指示使用方向。例如,标签可以指示制剂可用于或预期用于皮下给药。容纳制剂的容器可以是多次使用的管形瓶,这允许重复施用(例如,2-6次施用)水制剂。生产的产品还可以包含第二容器。生产的产品另外可以包括从商业和用户立场需要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有使用说明书的包装说明书。

[0249] 在本申请中引用的所有文献、专利和公开的专利申请的内容,都通过援引并入本文。

[0250] 下面的实施例进一步解释了本发明,它们不应当理解为限制性的。

## 实施例

[0251] 下面的实施例描述了关于水制剂的实验,所述水制剂包含水作为溶液介质。应当指出,在有些情况下,使用欧洲十进制表示法来指示小数位。例如,在表 31 中,数字“0,296”与“0.296”同义。

[0252] 实施例 1:渗滤/超滤阿达木单抗和 J695

[0253] 材料和方法

[0254] 使用纯水渗滤阿达木单抗和 J695。用纯水进行至少 5 倍体积交换后,将蛋白溶液超滤至至少 150mg/mL 的最终目标浓度。进行重量摩尔渗透压浓度、目检和蛋白浓度测量(OD280),以监视 DF/UF 处理过程中蛋白的状态。

[0255] 使用尺寸排阻色谱和离子交换色谱来表征与起始制剂例如药品(DS)原料和蛋白标准品相比每个最终的 DF/UF 产物中的蛋白稳定性。药品或“DS”代表活性药物成分,通常是指普通本体溶液中的治疗蛋白。

[0256] ●阿达木单抗药品,(阿达木单抗消光系数 280nm :1.39mL/mgcm)。药品不含有聚山梨醇酯 80。DS 组成 :5.57mM 磷酸二氢钠,8.69mM 磷酸氢二钠,106.69mM 氯化钠,1.07mM 柠檬酸钠,6.45mM 柠檬酸,66.68mM 甘露醇。

[0257] ●用于动态光散射(DLS)测量的阿达木单抗溶液:通过分别用 Milli-Q 水和赋形剂原液(赋形剂溶于 Milli-Q 水)稀释阿达木单抗溶液,将使用纯水作为交换介质渗滤的阿达木单抗溶液调节至 1mg/mL 浓度。

[0258] ● J695 药品,(J695 消光系数 280nm :1.42mL/mg cm)。DS 组成 :组氨酸,蛋氨酸,甘露醇,pH 5.8,和聚山梨醇酯 80。

[0259] ● Millipore Labscale™切向流过滤(TFF)系统,配有 500mL 贮器。根据 Millipore 操作手册,在环境温度以间断模式运行 Labscale TFF 系统。搅拌器速度设定在约 1.5,泵速度设定在约 3。目标入口和出口压力分别是 15mm psig 和约 50mm psig。

[0260] ● Minimate™切向流过滤膜盒,配有 Omega™ PES 膜,30kDa 截止。用 0.1N NaOH 冲洗膜盒 30min,用 Milli-Q 水冲洗另外 30min。

[0261] ● 780pH 计,Metrohm,配有 pH 探头 Pt1000,No. 6.0258.010,用缓冲校准溶液 VWR,pH 4.00 缓冲溶液红色,目录号 34170-127,和 pH 7.00 缓冲溶液黄色,目录号 34170-130,来校正。

[0262] ● Varian 50Bio 紫外可见分光光度计,AI 9655,固定的 Cary 50 格用于蛋白浓度测量(280nm 波长)。用水(Milli-Q 水用于 HPLC)稀释 100 μL 蛋白样品至 50.00mL 的终体积,DF/UF 后对所有 J695 样品和阿达木单抗溶液进行蛋白浓度测量。通过用 1960 μL

Milli-Q 水稀释 40  $\mu$ L 样品溶液, 监视所有其它阿达木单抗样品的浓度。一次性紫外比色皿, 1.5mL, 半微量, 聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA), 用于浓度测量。

[0263] ● Milli-Q 水用作 OD 280 空白。

[0264] ● 用于 HPLC 级别的 Milli-Q 水用作 DF/UF 介质。

[0265] ● Malvern Zetasizer Nano ZS, 仪器号 AI 9494 用于 DLS 测量。

[0266] ● Hellma 精密格, suprasil, 类别号 105.251-QS, 光程 3mm, 中心 8.5, 用于 DLS 测量(装有 75  $\mu$ L 样品, Malvern Mastersizer Nano ZS, 项目号 AI 9494)。

[0267] ● Knauer Osmometer Automatic, 仪器号 83963, Berlin, 德国, 用于重量摩尔渗透压浓度测量(用 400mOsmol/kg NaCl 校准溶液校正, 产品号 Y 1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, 德国)。

[0268] ● 250mL Corning 细胞培养瓶, 75cm<sup>2</sup>, 聚苯乙烯, 无菌的, Corning, NY, USA, 用于储存 DF/UF 操作后的蛋白溶液。

[0269] ● 氯化钠: J. T. Baker 用于制备 2M NaCl 原液。原液用于用不同浓度的 NaCl (10, 20, 30 和 50mM) 在纯水中制备 1mg/mL 阿达木单抗溶液。

[0270] ● D- 山梨醇, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178 用于制备 200mg/mL 山梨醇原液。原液用于用不同浓度的山梨醇 (10, 20, 30, 和 40mg/mL) 在纯水中制备 1mg/mL 阿达木单抗溶液。

[0271] HPLC 方法

[0272] ● 阿达木单抗, SEC 分析: Sephadex 200 柱 (Pharmacia 目录号 175175-01, S/N 0504057)。流动相 20mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠, pH 7.5, 0.5mL/min 流速, 环境温度, 检测紫外线 214nm 和 280nm。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL, 样品注射负载 50  $\mu$ g (一式两份注射)。

[0273] ● 阿达木单抗, IEC 分析: Dionex, Propac WCX-10 柱 (p/n 054993) 以及对应的保护柱 (p/n 054994)。分离条件: 流动相 A: 10mM 磷酸钠, pH 7.5; 流动相 B 10mM 磷酸钠, 500mM 氯化钠, pH 5.5。1.0mL/min 流速, 环境温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL, 样品注射负载 100  $\mu$ g, 一式两份注射。

[0274] ● J695, SEC 分析: Tosoh Bioscience G3000swx1, 7.8mm x 30cm, 5  $\mu$ m (目录号 08541)。流动相 211mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0。0.3mL/min 流速, 环境温度, 检测紫外线 214nm 和 280nm。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 2.5mg/mL, 样品注射负载 50  $\mu$ g (一式两份注射)。

[0275] ● J695, IEC 分析: Dionex, Propac WCX-10 柱 (p/n 054993) 以及对应的保护柱 (p/n 054994)。分离条件: 流动相 A: 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.0; 流动相 B 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500mM NaCl, pH 6.0。1.0mL/min 流速, 35°C 温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL, 样品注射负载 100  $\mu$ g。一式三份地运行 J695 参照标准品 29001BF 作为对照, 基于分析证书的浓度, 在 Milli-Q 水中稀释至 1mg/ml。

[0276] 蛋白浓度的计算

[0277] 计算公式:

$$[0278] \quad E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

- [0279]  $\epsilon$  ——吸收系数  
 [0280]  $c$  ——浓度  
 [0281]  $d$  ——光必须穿过的比色皿长度  
 [0282]  $E$  ——吸光度  
 [0283]  $I_0$  ——起始光强度  
 [0284]  $I$  ——穿过样品后的光强度  
 [0285]

$$\epsilon_{\text{阿达木单抗}} = 1.39 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

$$[0286] \quad \epsilon_{\text{J695}} = 1.42 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

$$[0287] \quad \epsilon_{\text{HSA}} = 1.042 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

[0288] 1.1:阿达木单抗的 DF/UF 处理

[0289] 按照 DF/UF 设备生产商的标准操作程序,进行 DF/UF 实验。例如,根据 Millipore 操作说明,给 Millipore Labscale™TFF 系统配有 500mL 贮器,在环境温度以间断模式运行系统。搅拌器速度设定在约 1.5,泵速度设定在约 3。目标入口和出口压力分别是 15mm psig 和约 50mm psig,监视目标压力,以确保它们没有被超过。

[0290] 使用 Minimate™切向流过滤膜盒,它配有 Omega™PES 膜 (Pall Corp., Port Washington, NY), 30kDa MWC0。在使用前,用 0.1N NaOH 冲洗膜盒 30min,用 Milli-Q 水冲洗另外 30min。

[0291] 将约 500mL 的阿达木单抗溶液置于 TFF 贮器中,以间断模式开始 DF/UF 处理。表 1 提供了表征 DF/UF 处理的过程中控制 (IPC) 数据的细节。

[0292] 表 1:阿达木单抗 DF/UF 处理概要

[0293]

处理步骤	加入的 Milli-Q 水的体积 (mL)	渗余物中阿达木单抗的大约体积 (mL)	渗余物的阿达木单抗浓度 (mg/mL)	重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol/kg)	渗透物的阿达木单抗浓度 (mg/mL)
1		500	54.66	305	-
2		400	68.33	297	3.15
3		300	-	-	-
4	250	550	43.73	169	1.39
5		300			4.45
6	250	550	47.27	93	2.58
7		250	-	-	-
8	250	500	-	-	-
9		250	-	-	-
10	250	500	-	-	-
11		250	-	-	-
12	250	500	52.24	9	1.24
13		300	90.27	7.5	-
14		130	213.87	-	4.08

[0294] 填写“-”的区域表示在该步骤中没有取 IPC 样品。

[0295] 约 5- 倍体积交换 (1 体积交换需要约 250mL 渗滤介质) 后, 停止 DF/UF 处理。假定理想的 100% 赋形剂膜渗透性, 应用的实验参数达到的理论最终赋形剂浓度是  $C_i (250/500)^5 = 0.03125 * C_i$ ,  $C_i$  是起始浓度。最大赋形剂减少因此是 96.875% (如果已经使用恒定体积渗滤, 5 个渗滤体积的理论赋形剂减少将是  $C_i e^{-5} = 0.00674$ , 即约 99.3% 最大赋形剂减少)。将阿达木单抗溶液从 TFF 系统排至 250mL 细胞培养瓶 (使用 WFI 对 TFF 系统进行低体积冲洗, 产生 175.05mg/mL 浓度; 如果不冲洗, 渗余物浓度是 213.87mg/mL)。取样测定 pH、重量摩尔渗透压浓度和阿达木单抗浓度。另外, 取样进行 SEC 和 IEC 表征。DF/UF 处理之前和之后的阿达木单抗溶液的特征参数分别列在表 2 中。

[0296] 表 2: DF/UF 处理对阿达木单抗溶液的影响

[0297]

参数	DF/UF处理前的溶液	DF/UF处理后的溶液
pH	5.19	5.22
浓度 (mg/mL)	54.66	175.05
重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol/kg)	305	24
*SEC 数据 (% 聚集体, 单体, 片段)	0.26 99.74 0.00	00.50 99.50 0.00
*IEC 数据 (酸性区域, lys 0, lys 1, lys 2, %)	13.89 62.05 19.14 4.83	14.07 61.97 18.51 4.73

[0298] \* 在通过 SEC 和 IEC 分析前样品进行一个冷冻 / 融化步骤 (-80°C / 25°C)

[0299] 在 DF/UF 处理过程中,阿达木单抗浓度超过 210mg/mL。在整个实验中,蛋白溶液保持澄清,没有观察到指示阿达木单抗溶解度极限的溶液朦胧或蛋白沉淀。与起始的阿达木单抗 DS 溶液 (~ 55mg/mL) 相比,使用纯水作为 DF/UF 交换介质渗滤过的阿达木单抗溶液显示出更低的乳色,尽管蛋白浓度增加至超过 3- 倍 (~ 175mg/mL)。

[0300] 1.2 :通过色谱表征阿达木单抗

[0301] 图 1 显示了与 DF/UF 处理操作之前 (中线) 和之后 (顶线) 的阿达木单抗药物标准品溶液相比,阿达木单抗参照标准品 (阿达木单抗标准品 (底线)) 的 SEC 色谱图。注意:在分析之前在 -80°C 冷冻所有样品。

[0302] 表 3 也含有 IEC 色谱图数据 (注意:在分析之前在 -80°C 冷冻所有样品)。

[0303] 表 3 :各种阿达木单抗样品的 IEC 数据

[0304]

样品名称	% 酸性区域1	% 酸性区域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
参照标准品	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
阿达木单抗DS	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
阿达木单抗, DF/UF后	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

[0305] 1.3 :赋形剂对阿达木单抗流体动力学直径 ( $D_h$ ) 的影响

[0306] 以前确定,当将 J695 配进纯水中时,通过动态光散射 (DLS) 测量测得的 J695 的流体动力学直径显著降低。在 WFI 中的 J695 具有 ~ 3nm 的  $D_h$ ,远低于预见到的免疫球蛋白的值。加入小量的可离子化 NaCl 后,  $D_h$  值增加至 ~ 10nm (不依赖于 NaCl 浓度)。非可离子化甘露醇的加入会增加 J695 溶液重量摩尔渗透压浓度,但是对 J695  $D_h$  无影响。

[0307] 为了评判赋形剂对已经根据上述 DF/UF 操作处理过的阿达木单抗的流体动力学直径的影响,使用来自 DF/UF 实验的阿达木单抗溶液在纯水中配制阿达木单抗溶液,但是分别使用不同水平的 NaCl (0-50mM) 和山梨醇 (0-40mg/mL)。在图 2 中显示了山梨醇 (非可

离子化赋形剂)和 NaCl(可离子化赋形剂)浓度对阿达木单抗单体的  $D_h$  的影响。

[0308] 阿达木单抗单体在纯水中的流体动力学直径是 2.65nm。阿达木单抗  $D_h$  对盐和非离子型赋形剂的响应与以前观察到的 J695 响应一致。阿达木单抗  $D_h$  实际上不受山梨醇存在的影响。低浓度的 NaCl 诱发单体流体动力学直径增加至预期的 ~ 11nm 的水平。这些发现证实,通过动态光散射测得的蛋白流体动力学直径受到可离子化赋形剂存在的重要影响。可离子化赋形剂的缺失也与溶液粘度相关。

[0309] 这些发现已经暗示,对于高浓度的蛋白溶液:流体动力学直径越低,蛋白占据的空间体积越小。在高浓度情况下,使用水作为 DF/UF 交换介质制备的蛋白溶液的粘度相当大地低于含有大量可离子化缓冲赋形剂的传统蛋白制剂的粘度。阿达木单抗数据证实这一点,因为发现在注射用水中的 200mg/mL 阿达木单抗溶液的粘度远低于 50mPas,且独立于 pH(例如 pH 4, pH 5, 和 pH 6)。在下面的实施例 17 中可以发现关于 pH 对  $D_h$  的影响的更多数据。

[0310] 总之,这些发现可以用于高浓度蛋白制剂活性,其中粘度相关的生产和给药/递送问题是众所周知的。此外,这些发现表明,根据需要,可以用非可离子化赋形剂例如糖或糖醇调节最终的药物产品的重量摩尔渗透压浓度值,而不诱发蛋白  $D_h$  和溶液粘度的增加。

[0311] 1.4 :J695(抗-IL12 抗体)的 DF/UF 处理

[0312] 用 1M 磷酸将约 200mL J695 溶液调节至 pH 4.4,装入 TFF 贮器(进行 pH 调节,以确保 J695 单体的正  $\zeta$  电位,从而避免不带电荷的蛋白单体对数据的潜在影响)。然后,将 300mL Milli-Q 水加入 TFF 贮器,以间断模式开始 DF/UF 处理。250mL 贮器体积,加入 250mL Milli-Q 水,再次开始 DF/UF 处理。进行共 5 倍体积交换(1 体积交换用约 250mL)步骤后,停止 DF/UF 处理。

[0313] 假定理想的 100% 赋形剂膜渗透性,应用的实验参数达到的理论最终赋形剂浓度是  $C_i(250/500)^5 = 0.03125 * C_i$ ,  $C_i$  是起始浓度。最大赋形剂减少因此是 96.875% (如果已经使用恒定体积渗滤,5 个渗滤体积的理论赋形剂减少将是  $C_i e^{-5} = 0.00674$ ,即约 99.3% 最大赋形剂减少)。将 J695 溶液从 TFF 系统排至 250mL 细胞培养瓶(不冲洗 TFF 系统)。取样测定 pH、重量摩尔渗透压浓度和 J695 浓度。另外,取样进行 SEC 和 IEC 表征。DF/UF 处理之前和之后的 J695 溶液的特征参数分别列在表 4 中。

[0314] 表 4 :DF/UF 处理对 J695 溶液的影响

[0315]

参数	DF/UF前的溶液	DF/UF后的溶液
pH	4.40	4.70
浓度(mg/mL)	122.9	192.8
重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol/kg)	265	40
SEC数据(%聚集体, 单体, 片段)	0.41 98.42 1.18	0.69 98.11 1.21
IEC数据(同种型, 酸性物质 碱性物质总和,%)	92.00 5.17 2.83	92.11 5.30 2.59

[0316] 象阿达木单抗一样, J695 的 DF/UF 实验证实了在使用纯水作为交换介质处理和配制 J695 的原理可行性。SEC 和 IEC 数据暗示, 使用 Milli-Q 水作为渗滤介质, 在环境温度 DF/UF 处理共 1.5 天 (晚上停止处理), 对 J695 稳定性没有实质影响。在整个实验中, 蛋白溶液保持澄清, 指示没有潜在的 J695 溶解度极限。

[0317] 1.5 : J695 表征

[0318] 表 5 描述了通过 SEC 色谱图测得的 3 种溶液的聚集体、单体和片段含量的百分比。

[0319] 表 5 : 来自 SEC 色谱图的数据

[0320]

样品名称	% 聚集体含量	% 单体含量	% 片段含量
参照标准品	0.45	98.00	1.56
DF/UF 前的 J695	0.41	98.42	1.18
DF/UF 后的 J695	0.69	98.11	1.21

[0321] 图 3 显示了 J695 参照标准品 (下图) 和 pH 调节至 pH 4.4 的 J695 DS (上图) 的 IEC 图谱。

[0322] 在 DF/UF 处理后, 在 J695 样品中仅观察到聚集体含量的微小增加。

[0323] 图 4 显示了用 Milli-Q 水 DF/UF 后 pH 4.7 的 J695 (上图) 和 pH 调节至 pH 4.4 的 DF/UF 之前的 J695 DS (下面曲线) 的 IEC 图谱。如图 4 所示, 当通过 IEC 监视时, DF/UF 步骤对 J695 稳定性没有显著影响。2 种 J695 参照标准品之间的差异 (见图 3) 可以归因于 3000L 和 6000L DS 生产之间的生产过程的差异。表 6 突出了 IEC 数据的更多细节。

[0324] 表 6 : 不同 J695 样品的 IEC 数据

[0325]

样品名称	0glu(1)	其它同种型	酸性	碱性
参照标准品	43.57	50.06	4.47	1.90
J695	35.74	56.26	5.17	2.83
DF/UF 后的 J695	36.59	55.52	5.30	2.59

[0326] 1.6 : 结论

[0327] 上面的实施例提供了渗滤 / 超滤 (DF/UF) 实验, 其中水 (Milli-Q 水用于 HPLC) 用作单克隆抗体阿达木单抗和 J695 的渗滤介质。

[0328] 使用纯水作为 DF/UF 交换介质, 对阿达木单抗进行 DF/UF 处理, 在 pH 5.2 在高浓度 (> 200mg/mL) 配制, 不会诱发溶液朦胧、严重的乳色或浑浊形成。一个随后的冷冻 / 融化步骤后, SEC 和 IEC 数据暗示, 通过 DF/UF 处理在水中配制的阿达木单抗溶液和起始阿达木单抗 DS 之间没有显著差异。

[0329] 使用纯水作为 DF/UF 交换介质,也对 J695 进行 DF/UF 处理,并在 pH 4.7 配制,没有影响 J695 稳定性(目检,SEC,IEC)。

[0330] 当使用这样的 DF/UF 处理配制时,阿达木单抗单体的流体动力学直径( $D_h$ )是约 2.65nm。证实了浓度最高达 40mg/mL 的非离子型赋形剂例如山梨醇的存在对  $D_h$  数据没有影响,而已经在低浓度的离子型赋形剂例如 NaCl 被证实会诱发阿达木单抗单体  $D_h$  增加至约 11nm(通常为 IgG 监视这样的  $D_h$  数据)。以前针对 J695 作出了类似的发现。

[0331] 总之,使用纯水作为 DF/UF 交换介质来处理 and 配制蛋白是可行的。假定理想的 100% 赋形剂膜渗透性,5 个渗滤体积的恒定体积渗滤达到的理论最终赋形剂浓度将是  $C_1 e^{-5} = 0.00674$ ,即约 99.3% 最大赋形剂减少。使用 6 渗滤体积交换,会产生理论的 ~99.98% 最大赋形剂减少。

[0332] 实施例 2 至 5 描述了关于在水制剂中浓缩的 3 种不同蛋白的实验方案,实施例 6 至 11 描述了每种水制剂的分析。

[0333] 实施例 2-11 的材料和方法

[0334] ● 在注射用水中的阿达木单抗蛋白溶液(10mg/mL),蛋白药品(DS)材料(49.68mg/mL),DS 含有吐温 80,阿达木单抗,阿达木单抗药物制剂(DP)(40mg,注射用溶液,来自商业生产的过滤的溶液)。蛋白吸收系数 280nm :1.39。

[0335] ● 在注射用水中的 J695 蛋白溶液(10mg/mL),蛋白药品(DS)(54mg/mL),DS 含有吐温 80。吸收系数 280nm :1.42。

[0336] ● 在注射用水中的 HSA 蛋白溶液(10mg/mL),DP 不含吐温 80,Grifols 人血清白蛋白 **Grifols<sup>®</sup>**, 20%, 50mL。吸收系数 280nm :1.042

[0337] ● 6R 管形瓶和 10R 管形瓶

[0338] ● 管形瓶准备:洗涤管形瓶,并高压灭菌

[0339] ● 塞子,19mm,West,4110/40/灰色

[0340] ● 样品容器(例如,Eppendorf 样品容器,安全锁或简单的搭扣配合(snap-fit), 1-2mL)

[0341] ● 一次性注射器,无菌的,20mL ;NormJect,10mL

[0342] ● 一次性过滤器单元(过滤器 **Millex<sup>®</sup>-GV**,注射器驱动过滤器单元,PVDF 0.22  $\mu$ m ; **Millex<sup>®</sup>-GP**,注射器驱动过滤器单元,PES 0.22  $\mu$ m, **Sterivex<sup>®</sup>** 0.22  $\mu$ m 过滤器单元)

[0343] ● Vivaspin 浓缩器(截止 10kDa, PES ;截止 3kDa, PES)

[0344] ● 吸量管(例如,Eppendorf,最大 :1000  $\mu$ L)

[0345] ● 注射用水

[0346] ● 离心机(Eppendorf)和离心机号 1(温度受控的)

[0347] ● 渗滤设备:Millipore LabScale<sup>™</sup> TFF 系统,Millipore 渗滤膜:阿达木单抗:聚醚砜;J695:聚醚砜;HSA:再生的纤维素

[0348] ● pH 探头(Metrohm pH-计,适合蛋白的探头,biotrode 46)

[0349] ● 层流台,Steag LF-Werkbank, Mp. -No. 12.5

[0350] ● NaCl ;甘露醇

- [0351] ● Gemini 150Peltier 平板电流计, Malvern
- [0352] ● 电流计 MCR 301 [ 温度受控的 P-PTD 200 ( 具有 Peltiertempering 的平板 ) ] 和锥体 / 平板测量系统 CP50/0.5° Ti 以及 CP50/1° ( 不锈钢 ); Anton Paar
- [0353] ● 毛细管粘度计, Schott, 毛细管 : 类型 537 20, 类型 537 10, 类型 537 13
- [0354] ● 1M 盐酸 ( J. T. Baker )
- [0355] 分析
- [0356] ● UV/VIS 分光光度法 ( OD 280nm ); 光子相关光谱学 ( PCS ) : 对于约 10mg/mL 和约 20mg/mL : 1. 1mPas, 3 次, 30s, 一次测量, 25°C, 从约 30mg/mL 和以上 : 1. 9mPas, 30s, 3 次, 一次测量, 25°C
- [0357] ● 尺寸排阻色谱 ( SEC ) 和离子交换色谱 ( IEC ), 如下所述。
- [0358] ● 粘度测量 : 使用具有各自的不同设置的不同粘度计
- [0359] 蛋白浓度的计算
- [0360] 计算公式 :

$$[0361] \quad E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

- [0362]  $\varepsilon$  —— 吸收系数
- [0363]  $c$  —— 浓度
- [0364]  $d$  —— 光必须穿过的比色皿长度
- [0365]  $E$  —— 吸光度
- [0366]  $I_0$  —— 起始光强度
- [0367]  $I$  —— 穿过样品后的光强度
- [0368]

$$\varepsilon_{\text{阿达木单抗}} = 1.39 \frac{mL}{mg \times cm}$$

$$[0369] \quad \varepsilon_{J695} = 1.42 \frac{mL}{mg \times cm}$$

$$[0370] \quad \varepsilon_{HSA} = 1.042 \frac{mL}{mg \times cm}$$

- [0371] 阿达木单抗的粘度数据和计算
- [0372] 阿达木单抗商业制剂 ( 约 194mg/mL ) 密度 :

$$[0373] \quad \rho = 1,05475 \frac{g}{cm^3}$$

- [0374] 阿达木单抗商业制剂 ( 约 194mg/mL ) 运动学粘度 :

- [0375]  $K$  —— 毛细管常数
- [0376]  $t$  —— 溶液穿过毛细管所需的时间 [s]
- [0377]  $\nu$  —— 运动学粘度

$$[0378] \quad \nu = K \times t = 0,03159 \frac{mm^2}{s^2} \times 279,36s = 8,825 \frac{mm^2}{s}$$

[0379] 阿达木单抗商业制剂 (约 194mg/mL) 动力学粘度 :

[0380]  $\eta$  ——动力学粘度

[0381]  $\rho$  ——密度

$$[0382] \quad \eta = \nu \times \rho = 8,825 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,05475 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{9,308 \text{mPas}}$$

[0383] 人血清白蛋白的粘度数据和计算

[0384] HSA 商业制剂 (约 200mg/mL) 密度 :

$$[0385] \quad \rho = 1,05833 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

[0386] HSA 商业制剂 (约 200mg/mL) 运动学粘度 :

[0387] K ——毛细管常数

[0388] t ——溶液穿过毛细管所需的时间 [s]

[0389]  $\nu$  ——运动学粘度

$$[0390] \quad \nu = K \times t = 0,01024 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2} \times 337,69 \text{s} = \underline{3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}}$$

[0391] HSA 商业制剂 (约 200mg/mL) 动力学粘度 :

[0392]  $\eta$  ——动力学粘度

[0393]  $\rho$  ——密度

$$[0394] \quad \eta = \nu \times \rho = 3,46 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,05833 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{3,662 \text{mPas}}$$

[0395] WFI 中的 HSA (约 180mg/mL) 密度 :

$$[0396] \quad \rho = 1,07905 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

[0397] WFI 中的 HSA (约 180mg/mL) 运动学粘度 :

[0398] K ——毛细管常数

[0399] t ——溶液穿过毛细管所需的时间 [s]

[0400]  $\nu$  ——运动学粘度

$$[0401] \quad \nu = K \times t = 0,09573 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}^2} \times 185,3 \text{s} = \underline{17,72 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}}}$$

[0402] WFI 中的 HSA (约 180mg/mL) 动力学粘度 :

[0403]  $\eta$  ——动力学粘度

[0404]  $\rho$  ——密度

$$[0405] \quad \eta = \nu \times \rho = 17,72 \frac{\text{mm}^2}{\text{s}} \times 1,07905 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = \underline{19,121 \text{mPas}}$$

[0406] 获得高浓度制剂的一般实验方案

[0407] 一般而言,本发明的获得高浓度的、无盐的蛋白制剂的方法包括,渗滤起始药品材料,然后是增加药品在溶液中的浓度的操作。这可以在分开的程序中实现,或可以在同一程序内的分开的或重叠的步骤中实现。

[0408] 渗滤

[0409] 对足够量的药品 (DS) 材料 (取决于 DS 的蛋白浓度) 进行渗滤。渗滤之前,用注射用水稀释 DS 材料~ 10mg/ml。注意:该实验需要共约 540mL 10mg/mL 溶液。

[0410] 注射用水用作渗滤介质。进行的渗滤步骤的数目是 5-7 (1 个渗滤步骤相当于 1 个总体积交换)。在渗滤之前和渗滤步骤之后,取过程中控制 (IPC) 样品 (200  $\mu$ L 用于重量摩尔渗透压浓度,120  $\mu$ L 用于 SEC)。

[0411] 通过应用下述参数,用 TFF 装置进行渗滤:

[0412] ● 搅拌器:位置 2

[0413] ● 泵:位置 2

[0414] ● 上流 / 入口压力:最大 20-30psi

[0415] ● 下流 / 出口压力:最大 10psi

[0416] (在该实验中使用的参数源自生产商的推荐。本领域技术人员能改变装置运行参数,以适应特定蛋白或装置、制剂、粘度和其它变量的变化)

[0417] 渗滤后,通过 OD280 评估蛋白浓度。如果蛋白浓度 > 10mg/mL,通过用注射用水适当稀释溶液,将蛋白浓度调至 10mg/mL。

[0418] 浓缩

[0419] 将 20mL 渗滤过的蛋白溶液 (例如,阿达木单抗, J695, HSA) 放入 Vivaspin 20 浓缩器。关闭浓缩器,放入离心机。以最大速度 (5000rpm) 离心蛋白溶液。

[0420] 取样

[0421] 如下取浓缩溶液的样品:10mg/mL,然后每隔 10mg/mL (20, 30, 40mg/ml 等),或直到蛋白聚集体可见,并如下分析样品:

[0422] ● 在 Vivaspin 浓缩器中均质化蛋白溶液,装入适当的管形瓶。

[0423] ● 直接在管形瓶中检查光学外观。

[0424] ● 300  $\mu$ L 用于紫外线光谱学,160  $\mu$ L 用于 PCS,120  $\mu$ L 用于 SEC,300  $\mu$ L 用于 IEX。

[0425] ● 在 -80°C 保藏用于 SEC 和 IEX 的样品。

[0426] 动态光散射 (DLS) 方案

[0427] 如下进行动态光散射:使用 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, MA), 其配有 Hellma 精密格 (Plainview, NY), suprasil quartz, 类型 105. 251-QS, 光程 3mm, 中心 Z8. 5mm, 至少 60  $\mu$ L 样品填充,使用蛋白样品原样,直接置于测量格中。测量之前,检查格窗,以证实溶液没有可能影响 DLS 测量的气泡或颗粒 / 灰尘 / 其它污染物。在标准操作程序下进行测量 ("一般目的" 模式, 25°C, 折光率设定在 1. 45, 测量模式设定在 "手动", 每个测量运行 1 次, 每次包含 3 次测量各 30s, 测量类型设定在 "大小")。使用分散技术软件, 4. 10b1 版, Malvern Instruments, 分析数据。将约 70  $\mu$ L 样品溶液装入精密格,用于分析流体动力学直径 ( $D_h$ )。对于低浓度的蛋白溶液 (例如 < 5mg/mL), 缺省样品粘度设定在 1. 1mPas。根本的测量原理总结出,待测量的样品溶液的真实粘度和使用的缺省粘度之间的微小差异基本上不会影响 DLS 数据读数。这可以如下验证:进行低蛋白浓度溶液 (< 5mg/mL) 的 DLS 测量,其中测定溶液粘度,并在随后的 DLS 测量中予以考虑。对于具有更高蛋白浓度的所有样品,测定粘度,并在 DLS 测量过程中予以考虑。

[0428] 实施例 2:包含高 TNF  $\alpha$  抗体浓度的制剂

[0429] 2. 1:渗滤

[0430] 在渗滤之前,用注射用水稀释阿达木单抗(49.68mg/mL)至约15mg/mL的浓度。因此,将140.8mL阿达木单抗溶液(49.68mg/mL)装入500mL容量瓶。用注射用水填充容量瓶至校正标记。封闭容量瓶,轻轻摇动,使溶液均质化。用水冲洗TFF labscale系统。然后,装上膜(PES),也用1L蒸馏水冲洗。接着,用约300mL注射用水冲洗TFF labscale系统和膜。然后将稀释的阿达木单抗溶液装入TFF的贮器。取样用于重量摩尔渗透压浓度测量(300 $\mu$ L)、UV分光光度法(500 $\mu$ L),并取样用于SEC分析(120 $\mu$ L)。关闭系统,开始渗滤。5倍体积交换后和达到3mosmol/kg的重量摩尔渗透压浓度值后,结束DF/UF(渗滤/超滤)。渗滤后阿达木单抗溶液的pH-值是pH 5.25。

[0431] 通过应用下述参数,用TFF装置进行渗滤:

[0432] ●搅拌器:位置2

[0433] ●泵:位置2

[0434] ●上流/入口压力:最大20-30psi

[0435] ●下流/出口压力:最大10psi

[0436] 渗滤后,通过OD280评估蛋白浓度。测得的浓度是13.29mg/mL。

[0437] 无菌过滤阿达木单抗溶液。

[0438] 用约1L蒸馏水、然后用500mL 0.1M NaOH,冲洗TFF和膜。在0.1M NaOH中保存膜,再次用约500mL蒸馏水冲洗TFF。

[0439] 2.2:蛋白浓缩

[0440] 在浓缩抗体之前,再次通过OD280评估蛋白浓度。测得阿达木单抗浓度是13.3mg/mL。然后将阿达木单抗溶液稀释至10mg/mL。将375.94mL阿达木单抗溶液(13.3mg/mL)装入500mL容量瓶,用注射用水(WFI)将容量瓶填至校正标记。也将75.19mL阿达木单抗溶液(13.3mg/mL)装入100mL容量瓶,用纯水即注射用水(WFI)填至校正标记。轻轻摇动2个容量瓶至均质化。将来自2个容量瓶的溶液置于1L PETG瓶子中。轻轻摇动瓶子至均质化。

[0441] 使用4个Vivaspin 20浓缩器(10kDa)。在3个Vivaspins中,装入20mL阿达木单抗溶液(10mg/mL)(每个)。在第4个Vivaspin装置中,装入水作为离心时的抗衡重量。关闭浓缩器,放入离心机。应用4500x g离心力,离心阿达木单抗溶液(在甩开转头中)。

[0442] 2.3:取样

[0443] 当它们达到10mg/mL的浓度时和在每个随后的10mg/mL浓度增量增加(在20mg/mL,30mg/mL,40mg/mL等,直到约200mg/mL),对浓缩的阿达木单抗溶液取样。每隔40分钟,将浓缩器取出离心机,将溶液均质化,在冰上冷却溶液和离心机结合器约10min。每个10mg/mL浓度增加后,将浓缩器中的溶液均质化,检查光学外观,取样用于UV(300 $\mu$ L)、PCS(160 $\mu$ L)、SEC(120 $\mu$ L)和IEC(300 $\mu$ L)分析。取样后,用阿达木单抗溶液(10mg/mL)填充浓缩器至约20mL。

[0444] 对蛋白沉淀进行目检和PCS分析,以确定阿达木单抗蛋白(即同种型)在溶液中的溶解度极限。

[0445] 在约80mg/mL的浓度,显然阿达木单抗溶液不再是乳色的,乳色是具有大量片段的阿达木单抗溶液的已知特征。因此,怀疑在实验过程中可能已经发生断裂。为了进一步分析,通过SEC分析阿达木单抗溶液(约80mg/mL)的样品。将每个Vivaspin中的剩余溶

液、以及剩余的阿达木单抗溶液 (10mg/mL) 移至 50mL falcon 试管,并在 -80℃ 保藏。SEC 分析显示出 99.6% 单体的纯度。

[0446] 在 25℃ 在水浴中融化溶液,并无菌过滤。然后,将来自 3 个 falcon 试管的溶液置于每个 Vivaspin。将浓缩器填充至约 20mL,继续浓缩。当达到约 200mg/mL 的浓度时,结束实验。

[0447] 在进一步分析之前,在 -80℃ 保藏所有 SEC 和 IEC 样品。取样后直接测量 UV 和 PCS。将剩余的浓缩的阿达木单抗溶液置于 Eppendorf 容器中,在 -80℃ 保藏。

[0448] 下面显示的表 7 描述了在浓缩阿达木单抗溶液时要重新装入浓缩器中的蛋白溶液的体积的计算。在实验执行之前计算该计划,以确定取样体积。表 8 显示了离心持续时间。

[0449] 表 7 :离心计划

[0450]

	步骤	体积 [ml]	浓度 [mg/ml]	体积 10mg/mL 蛋白溶液
	0	20	10	
浓缩	1	10	20	
取样	2	9	20	
填充	3	20	14,5	11
浓缩	4	9,66	30	
取样	5	8,66	30	
填充	6	20	18,66	11,34
浓缩	7	9,33	40	
取样	8	8,33	40	
填充	9	20	22,49	11,67
浓缩	10	8,99	50	
取样	11	7,99	50	
填充	12	20	25,98	12,01
浓缩	13	8,66	60	
取样	14	7,66	60	
填充	15	20	29,15	12,34
浓缩	16	8,32	70	
取样	17	7,32	70	
填充	18	20	31,96	12,68
浓缩	19	7,99	80	
取样	20	6,99	80	
填充	21	20	34,46	13,01
浓缩	22	7,65	90	
取样	23	6,65	90	
填充	24	20	36,6	13,35
浓缩	25	7,32	100	
取样	26	6,32	100	
填充	27	20	38,44	13,68
浓缩	28	6,98	110	
取样	29	5,98	110	
填充	30	20	39,9	14,02
浓缩	31	6,65	120	
取样	32	5,65	120	
填充	33	20	41,07	14,35
浓缩	34	6,31	130	
取样	35	5,31	130	
填充	36	20	41,86	14,69
浓缩	37	5,98	140	
取样	38	4,98	140	
浓缩	39	4,64	150	154,14

[0451] 表 8 :浓缩阿达木单抗溶液所需的离心时间

[0452]

浓度[起点→终点] [mg/mL]	时间[分]
10 至 20	15
20 至 30	20
30 至 40	27
40 至 50	30
50 至 60	40
60 至 70	50
70 至 80	60
80 至 90	67
90 至 100	80
100 至 110	100
110 至 200	206

[0453] 下面在表 12 中也显示了浓缩阿达木单抗的结果。

[0454] 2.4:粘度测量

[0455] 测量包含在 WFI 中的 50mg/mL 或在 WFI 中的 200mg/mL 阿达木单抗溶液的粘度。使用 Gemini 150 Peltier 平板电流计, Malvern, 测量在 WFI 中的 50mg/mL 和 200mg/mL, 通过电流计 MCR 301 [ 温度受控的 P-PTD 200 ( 经过 Peltier 回火的平板 ) ] 和锥体 / 平板测量系统 CP50/1 ( 不锈钢 ); Anton Paar), 也测量在 WFI 中的 200mg/mL 溶液。

[0456] 融化储存试管中的阿达木单抗溶液 (200mg/mL), 在 6R 管形瓶中均质化。用 3mL WFI 稀释 1mL 阿达木单抗 (200mg/mL), 得到稀释的溶液 (50mg/mL 阿达木单抗溶液)。

[0457] 对于电流计 Gemini 150, 需要约 2mL, 对于 MCR 301, 需要小于 1mL 用于测量。

[0458] 使用 Vivaspin 试管, 得到在商业制剂中的阿达木单抗 (约 194mg/mL)。用在商业缓冲液中的阿达木单抗溶液填充试管, 离心直到达到 194mg/mL 浓度。用毛细管粘度计 Schott 测量粘度。

[0459] 2.5:总结

[0460] 总之, 在 4 个不同试管中, 在 Vivaspin 20 试管中将阿达木单抗从 50mg/mL 浓缩至约 194mg/mL。在开始时, 20mL 阿达木单抗溶液 (50mg/mL) 在每个试管中 (4 个试管)。在浓缩结束时, 5mL 阿达木单抗溶液 (约 194mg/mL) 在每个试管中。在 5000rpm (约 4500g) 进行浓缩步骤。每小时后, 在碎冰中冷却长方形烧杯和在 Vivaspin 试管中的蛋白溶液约 10-15min。用密度测量装置 DMA 4500, Anton Paar, 测量密度。在实施例 5-11 中, 提供了高阿达木单抗浓度制剂的其它分析。

[0461] 实施例 3:包含高浓度 IL-12 抗体的制剂

[0462] 3.1:渗滤

[0463] 在渗滤之前, 用注射用水稀释 IL-12 抗体 J695 (54mg/mL) 至约 15mg/mL 的浓度。这如下实现:将 150mL J695 溶液 (54mg/mL) 装入 500mL 容量瓶, 用注射用水填充容量瓶至校正标记。封闭容量瓶, 轻轻摇动, 使溶液均质化。用水冲洗 TFF labscale 系统。然后, 装上聚醚砜膜 (PES), 也用 1L 蒸馏水冲洗。接着, 用约 300mL 注射用水冲洗 TFF labscale 系统和膜。然后, 将稀释的 J695 溶液装入 TFF 的贮器。取样用于重量摩尔渗透压浓度测量 (300  $\mu$ L)、UV 分光光度法 (500  $\mu$ L), 并取样用于 SEC 分析 (120  $\mu$ L)。关闭系统, 开始渗滤。DF 处理 200mL 体积后, 停止渗滤, 取另一份样用于紫外线测量。1800mL 渗滤体积 (约 3.5

倍体积交换)后,停止 DF/UF,达到 4mosmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度值。渗滤后 J695 溶液的 pH 值是 pH 6.48。

[0464] 通过应用下述参数,用 TFF 装置进行渗滤:

[0465] ●搅拌器:位置 2

[0466] ●泵:位置 2

[0467] ●上流/入口压力:最大 20-30psi

[0468] ●下流/出口压力:最大 10psi

[0469] 渗滤后,通过 OD280 评估蛋白浓度。测得的浓度是 16.63mg/mL。

[0470] 无菌过滤 J695 溶液。

[0471] 用约 1L 蒸馏水、然后用 500mL 0.1M NaOH,冲洗 TFF 仪器和膜。在 0.1M NaOH 中保存膜,再次用约 500mL 蒸馏水冲洗 TFF。

[0472] 3.2:浓缩

[0473] 在浓缩之前,将 J695 溶液稀释至 10mg/mL:将 316mL J695 溶液 (16.63mg/mL) 装入 500mL 容量瓶,用注射用水 (WFI) 将容量瓶填至校正标记。另外,也将 64mL J695 溶液 (16.63mg/mL) 装入 100mL 容量瓶,用 WFI 填至校正标记。轻轻摇动 2 个容量瓶至均质化。将来自 2 个容量瓶的溶液置于 1L PETG 瓶子中。轻轻摇动瓶子至均质化。

[0474] 使用 4 个 Vivaspin 20 浓缩器 (10kDa 截止)。在 3 个 Vivaspins 中的每个中,装入 20mL J695 溶液 (10mg/mL)。在第 4 个 Vivaspin 浓缩器装置中,装入水作为离心时的抗衡重量。关闭浓缩器,放入离心机。应用 4500x g 离心力,离心 J695 溶液 (在甩开转头中)。

[0475] 3.3:取样

[0476] 当它们达到 10mg/mL 的浓度时和在每个随后的 10mg/mL 浓度增量增加 (在 20mg/mL, 30mg/mL, 40mg/mL 等,直到 200mg/mL),对浓缩的 J695 溶液取样。每 40 分钟后,将浓缩器取出离心机,将溶液均质化,在冰上冷却溶液和离心机结合器约 10min。每个 10mg/mL 浓度增加后,将浓缩器中的溶液均质化,检查光学外观,取样用于 UV (300  $\mu$ L)、PCS (160  $\mu$ L)、SEC (120  $\mu$ L) 和 IEC (300  $\mu$ L) 分析。取样后,用 J695 溶液 (10mg/mL) 填充浓缩器至约 20mL。

[0477] 进行目检和 PCS 分析,以确定 J695 的溶解度 (即检查潜在沉淀) 和稳定性。

[0478] 在实验结束时,达到约 200mg/mL 的浓度。

[0479] 在 -80°C 保藏所有 SEC 和 IEC 样品用于进一步分析 (参见下面)。每次取样后直接进行 UV 分光光度法和 PCS 测量。将剩余的浓缩的 J695 溶液置于 Eppendorf 容器中,在 -80°C 保藏。

[0480] 在上面的表 7 中提供了关于离心计划的细节。在表 9 中提供了 J695 离心持续时间。

[0481] 表 9:用于浓缩 J695 溶液的离心时间

[0482]

浓度 [起点->终点] [mg/mL]	时间 [分]
10 至 20	13
20 至 30	22
30 至 40	27
40 至 50	38
50 至 60	45
60 至 70	80
70 至 80	90
80 至 90	105
90 至 100	165
100 至 200	270

[0483] 3.4 : 赋形剂对 J695 的流体动力学直径的影响

[0484] 在该实验中,分别分析了氯化钠和甘露醇对 J695 的流体动力学直径的影响。为此目的,制备了氯化钠 (12mg/mL) 和甘露醇 (120mg/mL) 的原液。称量 1.2g NaCl 到装有约 70mL WFI 的烧杯中,称量 12.002g 甘露醇到装有约 70mL WFI 的烧杯中。搅拌 2 份溶液至均质化。将每份溶液置于容量瓶中,用 WFI 填至校正标记。轻轻摇动容量瓶至均质化。

[0485] 在 37°C 融化约 8mL J695 溶液 (约 200mg/mL)。将溶液装入 10R 管形瓶,并均质化。给 7 个 2R 管形瓶中的每一个装入 500  $\mu$ L J695 溶液 (约 200mg/mL)。装填计划如下面的表 10 所示。

[0486] 表 10 : 用于制备含有不同浓度的 NaCl 或甘露醇的 J695 溶液的装填计划

[0487]

赋形剂	赋形剂浓度	体积 ABT-874 (200mg/ml) [ $\mu$ L]	NaCl 原液体积 (12mg/mL) [ $\mu$ L]	甘露醇原液 体积 (12mg/mL) [ $\mu$ L]	WFI 体积 [ $\mu$ L]
-	-	500	-	-	500
NaCl	2mg/mL	500	167	-	333
NaCl	4mg/mL	500	333	-	167
NaCl	6mg/mL	500	500	-	-
甘露醇	20mg/mL	500	-	167	333
甘露醇	40mg/mL	500	-	333	167
甘露醇	60mg/mL	500	-	500	-

[0488] 通过摇动,轻轻地使 2R 管形瓶均质化。此后,取不同 J695 溶液 (100mg/mL) 进行 PCS 和重量摩尔渗透压浓度测量。

[0489] 为了制备用于 PCS 分析的样品,首先用 50  $\mu$ L 样品冲洗比色皿。然后,使用 100  $\mu$ L 样品进行测量。

[0490] 在实施例 5 至 11 中提供了高 J695 浓度制剂的进一步分析。

[0491] 实施例 4 : 高浓度人血清白蛋白 (HSA) 制剂

[0492] 4.1 : 渗滤

[0493] 在渗滤之前,用注射用水稀释 HSA 溶液 (200mg/mL, 商业制剂) 至 15.29mg/mL 的浓度。为此,将 38mL HSA (200mg/mL) 装入 500mL 容量瓶。用注射用水填充容量瓶至校正标记。封闭容量瓶,轻轻摇动,使溶液均质化。用水冲洗 TFF labscale 系统。然后,装上膜 (再生的纤维素),也用 1L 蒸馏水冲洗。接着,用约 300mL 注射用水冲洗 TFF labscale 系统和膜。然后,将稀释的 HSA 溶液装入 TFF 的贮器。取样用于重量摩尔渗透压浓度测量 (300  $\mu$ L)、UV

分光光度法 (500  $\mu$  L), 并取样用于 SEC 分析 (120  $\mu$  L)。关闭系统, 开始渗滤。渗滤约 300mL 体积后, 取渗透物进行紫外线测量。渗透物揭示 2.74mg/mL 的浓度, 指示蛋白正穿过膜。约 500mL DF 后, 停止渗滤, 取另一份样用于紫外线测量 (HSA 浓度 11.03mg/mL)。950mL 渗滤体积 (约 2 体积交换) 后和达到 4mosmol/kg 的重量摩尔渗透压浓度值后, 结束 DF/UF。渗滤后 HSA 溶液的 pH 值是 pH 7.13。

[0494] 对渗透物进行 UV 分光光度法测量 3 次 ( $n = 3$ )。

[0495] 通过应用下述参数, 用 TFF 装置进行渗滤:

[0496] ● 搅拌器: 位置 2

[0497] ● 泵: 位置 2

[0498] ● 上流 / 入口压力: 最大 20-30psi

[0499] ● 下流 / 出口压力: 最大 10psi

[0500] 渗滤后, 通过 OD280 评估蛋白浓度。测得的浓度是 9.41mg/mL。

[0501] 无菌过滤 HSA 溶液。用约 1L 蒸馏水冲洗 TFF 和膜。然后, 进行完整性实验 (参见操作规程 LabScale™ TFF 系统, 第 5-3 至 5-5 页, 1997)。体积流是 1.2mL/min, 因而, 通过完整性实验 (可接受的最大限 3mL/min)。再次用 500mL 蒸馏水冲洗膜, 然后用 500mL 0.05M NaOH 冲洗。在 0.05M NaOH 中保存膜, 再次用约 500mL 蒸馏水冲洗 TFF。

[0502] 4.2: 浓缩过程

[0503] 在浓缩 HSA 蛋白溶液之前, 通过 OD280 评估浓度, 测得是 9.52mg/mL。使用 4 个 Vivaspin 20 浓缩器 (10kDa)。在 3 个 Vivaspins 浓缩器中的每个中, 装入 20mL HSA 溶液 (9.52mg/mL)。在第 4 个 Vivaspin 中, 装入水作为离心时的抗衡重量。关闭浓缩器, 放入离心机。应用 4500x g 离心力, 离心 HSA 溶液 (在甩开转头中)。

[0504] 4.3: 取样

[0505] 当浓度达到 10mg/mL 时和随后在每个 10mg/mL 浓度增量增加 (在 20mg/mL, 30mg/mL, 40mg/mL 等, 直到约 180mg/mL) 后, 对浓缩的 HSA 溶液取样。每隔 40 分钟, 将浓缩器取出离心机, 将溶液均质化, 在冰上冷却溶液和离心机结合器约 10min。每个 10mg/mL 浓度增量增加后, 将浓缩器中的溶液均质化, 检查光学外观, 取样用于 UV (300  $\mu$  L)、PCS (160  $\mu$  L)、SEC (120  $\mu$  L) 和 IEC (300  $\mu$  L) 分析。取样后, 将 HSA 溶液 (9.52mg/mL) 加入浓缩器至约 20mL。

[0506] 当计划的浓缩器中的 HSA 溶液浓度达到约 20mg/mL 时, 通过 OD280 测量渗透物, 揭示 0.5964mg/mL 的浓度。HSA 溶液的浓度仅仅是 15.99mg/mL, 这小于预期值。通过 SEC 分析在 WFI 中的浓缩的 HSA 的样品 (10mg/mL), 以考察潜在的断裂。将 Vivaspins 中的 HSA 溶液 (15.99mg/mL) 置于 falcon 试管, 在 -80°C 保藏。用于填充浓缩器的剩余的起始 HSA 溶液 (9.52mg/mL) 也在 -80°C 保藏。

[0507] 进行 SEC 分析, 以确定 HSA 蛋白是否经历降解, 生成能穿过膜的小片段。但是, SEC 分析揭示, 在 WFI 中的 10mg/mL HSA 有 92.45% 的单体量, 实际上没有片段。

[0508] 在 25°C 融化在 -80°C 保藏的溶液, 并无菌过滤。将 falcon 试管中的溶液各自转入 1 个 Vivaspin 20 浓缩器 (3kDa 截止)。用 HSA 溶液 (9.52mg/mL) 装填 Vivaspins, 并离心 (参见上述的 3.2 浓缩过程)。

[0509] 使用目检和 PCS 分析来确定 HSA 的溶解度极限。

[0510] 在实验结束时, 达到约 180mg/mL HSA 的浓度。

[0511] 在  $-80^{\circ}\text{C}$  保藏所有 SEC 和 IEC 样品用于进一步分析。取样后直接进行 UV 和 PCS 测量。将剩余的浓缩的 HSA 溶液置于 Eppendorf 容器中,在  $-80^{\circ}\text{C}$  保藏。

[0512] 在上面的表 7 中描述了离心计划的概况。在表 11 中描述了用于浓缩 HSA 的离心持续时间。

[0513] 表 11 :浓缩 HSA 溶液所需的离心时间

[0514]

浓度 [起点→终点] [mg/mL]	时间 [分]
10 至 20	9
20 至 30	30
30 至 40	40
40 至 50	50
50 至 60	80
60 至 70	90
70 至 80	110
80 至 90	130
90 至 100	170
100 至 180	360

[0515] 4.4 :pH 值对 HSA 的流体动力学直径的影响

[0516] 进行下述的实验部分来评价当蛋白溶于 WFI 时 pH 对 HSA 的流体动力学直径的潜在影响。给 4 个 6R 管形瓶装填 5.09mL HSA 溶液 (9.83mg/mL),用 1M HCl 将 pH 值调至 3-6 (实际 pH :3.04,3.99,5.05,6.01)。将这些溶液各自移至分开的 10mL 容量瓶。然后将容量瓶填至校正标记,轻轻摇动至均质化。

[0517] 将 HCl 溶液置于 10R 管形瓶中,通过 PCS 进行分析。无菌过滤溶液,再次通过 PCS 进行测量。另外,将 5.09mL HSA 溶液 (9.83mg/mL) 移入 10mL 容量瓶,用 WFI 填至校正标记。轻摇容量瓶至均质化,然后无菌过滤溶液,通过 PCS 进行测量。

[0518] 用于 PCS 测量的样品制备 :

[0519] 用  $50\ \mu\text{L}$  样品冲洗比色皿。用  $100\ \mu\text{L}$  样品体积进行测量。

[0520] 4.5 :粘度测量

[0521] 对于商业制剂中的 HSA (200mg/mL) 和 WFI 中的 HSA (约 180mg/mL),用毛细管粘度计 (Schott, MP. -No. 33. 2) 测量粘度。

[0522] 从 50mL 瓶子的商业制剂 HSA 取 15mL 等分试样。在约  $20^{\circ}\text{C}$  融化在 WFI 中的 HSA,取等分试样约 9mL 在 Falcon 试管中。用密度测量装置 DMA 4500, Anton Paar, 测量密度。

[0523] 在实施例 5-11 中提供了高 HSA 浓度制剂的进一步分析。

[0524] 实施例 5 :高蛋白制剂的分析——光学外观

[0525] 不同于商业制剂中的阿达木单抗,在 WFI 中的阿达木单抗不表现出乳色。当溶于 WFI 时, J695 也不表现出任何乳色现象。尽管事实上阿达木单抗在 WFI 中的蛋白浓度是 80mg/mL 和 200mg/mL,实际上没有观察到乳色。相反,包含 50mg/mL 阿达木单抗的商业制剂在商业制剂中显示出显著的乳色。因而,使用纯水即 WFI 作为溶解介质,对蛋白溶液乳色具有积极作用。

[0526] 令人惊奇地发现 (除了这样的高蛋白浓度完全可溶以外),在 WFI 中的阿达木单抗表现出具有低粘度,甚至在更高的浓度例如 200mg/mL。

[0527] 依赖于浓度, HSA 溶液的光学特征 / 颜色从澄清和浅黄 (在 WFI 中 10mg/mL) 变成澄清和黄色 (在 WFI 中约 180mg/mL)。

[0528] 在浓缩过程中, 对于阿达木单抗溶液和 HSA 溶液而言没有观察到沉淀。沉淀是溶解度极限的指示。在实验结束之前, 溶液保持澄清。应当指出, 因为达到了潜在的溶解度极限, 且发生了沉淀, 没有完成实验, 但是因为浓缩器中保持的溶液体积不足以继续进行浓缩 (即缺少材料), 结束了实验。看起来非常可能地, 阿达木单抗、J695 和 HSA 的溶解度极限都远远超过 220mg/mL。

[0529] 在 J695 溶液中, 当在 2-8°C 在浓缩器中保存高度浓缩的溶液 (约 120mg/mL) 过夜时, 观察到晶体状沉淀。当在环境温度保存溶液时, 约 3-5min 后, 晶体状沉淀重新溶解。因而, 通过在高浓度在纯水中溶解 J695 建立的环境, 会提供这样的条件, 其中通过单纯的温度循环 (例如, 从环境温度至 2-8°C), 可以实现蛋白结晶化。

[0530] 实施例 6 : 高蛋白制剂的分析——蛋白浓度

[0531] 上面在材料和方法部分提供了蛋白浓度的计算。

[0532] 下面在表 12-14 中提供了在纯水中浓缩阿达木单抗、J695 和 HSA, 高蛋白制剂的情况 :

[0533] 表 12 : 浓缩过程中通过 OD280 评估的阿达木单抗的浓度

[0534]

样品名称	吸光度	平均值	稀释	浓度
在 WFI 中的阿达木单抗 10mg/mL	0.680	0.650	20	9.35
	0.695			
	0.575			
在 WFI 中的阿达木单抗 20mg/mL 1	1.064	0.813	40	23.40
	0.688			
	0.687			
在 WFI 中的阿达木单抗 20mg/mL 2	0.781	0.788	40	22.68
	0.793			
	0.791			
在 WFI 中的阿达木单抗 20mg/mL 3	0.870	0.824	40	23.71
	0.883			
	0.719			

[0535]

样品名称	吸光度	平均值	稀释	浓度
在 WFI 中的阿达木单抗 30mg/mL 1	0, 817	0, 807	60	34, 84
	0, 812			
	0, 793			
在 WFI 中的阿达木单抗 30mg/mL 2	0, 839	0, 827	60	35, 69
	0, 813			
	0, 829			
在 WFI 中的阿达木单抗 30mg/mL 3	0, 770	0, 744	60	32, 10
	0, 729			
	0, 732			
在 WFI 中的阿达木单抗 40mg/mL 1	0, 494	0, 491	100	35, 35
	0, 493			
	0, 488			
在 WFI 中的阿达木单抗 40mg/mL 2	0, 499	0, 501	100	36, 06
	0, 516			
	0, 489			
在 WFI 中的阿达木单抗 40mg/mL 3	0, 495	0, 512	100	36, 81
	0, 523			
	0, 517			
在 WFI 中的阿达木单抗 50mg/mL 1	0, 574	0, 585	100	42, 11
	0, 579			
	0, 603			
在 WFI 中的阿达木单抗 50mg/mL 2	0, 671	0, 634	100	45, 63

	0, 630			
	0, 601			
在 WFI 中的阿达木单抗 50mg/mL 3	0, 579	0, 574	100	41, 27
	0, 574			
	0, 588			
在 WFI 中的阿达木单抗 60mg/mL 1	0, 838	0, 837	100	60, 21
	0, 833			
	0, 840			
在 WFI 中的阿达木单抗 60mg/mL 2	0, 793	0, 777	100	55, 89
	0, 767			
	0, 770			
在 WFI 中的阿达木单抗 60mg/mL 3	0, 802	0, 780	100	56, 10
	0, 759			
	0, 779			
在 WFI 中的阿达木单抗 70mg/mL 1	0, 911	0, 878	100	63, 15
	0, 866			
	0, 857			
在 WFI 中的阿达木单抗 70mg/mL 2	1, 012	0, 996	100	71, 68
	0, 975			
	1, 001			
在 WFI 中的阿达木单抗 70mg/mL 3	0, 879	0, 871	100	62, 66
	0, 874			
	0, 861			

[0536]

样品名称	吸光度	平均值	稀释	浓度
在 WFI 中的阿达木单抗 80mg/mL 1	0, 512	0, 510	200	73, 45
	0, 489			
	0, 531			
在 WFI 中的阿达木单抗 80mg/mL 2	0, 542	0, 526	200	75, 64
	0, 519			
	0, 517			
在 WFI 中的阿达木单抗 80mg/mL 3	0, 551	0, 531	200	76, 42
	0, 511			
	0, 531			
在 WFI 中的阿达木单抗 90mg/mL 1	0, 550	0, 547	200	78, 64
	0, 550			
	0, 539			
在 WFI 中的阿达木单抗 90mg/mL 2	0, 549	0, 548	200	78, 80
	0, 551			
	0, 543			
在 WFI 中的阿达木单抗 90mg/mL 3	0, 532	0, 534	200	76, 81
	0, 533			
	0, 537			
在 WFI 中的阿达木单抗 100mg/mL 1	0, 640	0, 628	200	90, 36
	0, 621			
	0, 623			
在 WFI 中的阿达木单抗 100mg/mL 2	0, 748	0, 747	200	107, 41
	0, 735			

	0, 757			
在 WFI 中的阿达木单抗 100mg/mL 3	0, 625	0, 621	200	89, 39
	0, 616			
	0, 623			
在 WFI 中的阿达木单抗 110mg/mL 1	0, 674	0, 669	200	96, 19
	0, 671			
	0, 660			
在 WFI 中的阿达木单抗 110mg/mL 2	0, 693	0, 668	200	96, 05
	0, 690			
	0, 620			
在 WFI 中的阿达木单抗 110mg/mL 3	0, 604	0, 640	200	92, 05
	0, 664			
	0, 652			
在 WFI 中的阿达木单抗 200mg/mL 1	0, 863	0, 698	400	201, 00
	0, 612			
	0, 621			
在 WFI 中的阿达木单抗 200mg/mL 2	1, 055	0, 791	400	227, 53
	0, 658			
	0, 659			
在 WFI 中的阿达木单抗 200mg/mL 3	0, 732	0, 665	400	191, 44
	0, 648			
	0, 615			

[0537] 表 13 :浓缩过程中通过 OD280 评估的 J695 的浓度

[0538]

样品名称	吸光度	平均值	稀释	浓度
在 WFI 中的 ABT-874 10mg/mL	0, 715	0, 703	20	9, 90
	0, 708			
	0, 705			
在 WFI 中的 ABT-874 20mg/mL 1	0, 686	-	40	19, 31
在 WFI 中的 ABT-874 20mg/mL 2	0, 684	-	40	19, 26
在 WFI 中的 ABT-874 20mg/mL 3	0, 685	-	40	19, 29
在 WFI 中的 ABT-874 30mg/mL 1	0, 700	-	60	29, 59
在 WFI 中的 ABT-874 30mg/mL 2	0, 703	-	60	29, 70
在 WFI 中的 ABT-874 30mg/mL 3	0, 684	-	60	28, 91
在 WFI 中的 ABT-874 40mg/mL 1	0, 539	-	100	37, 97
在 WFI 中的 ABT-874 40mg/mL 2	0, 540	-	100	38, 02
在 WFI 中的 ABT-874 40mg/mL 3	0, 520	-	100	36, 65
在 WFI 中的 ABT-874 50mg/mL 1	0, 698	-	100	4g, 15
在 WFI 中的 ABT-874 50mg/mL 2	0, 653	-	100	45, 95
在 WFI 中的 ABT-874 50mg/mL 3	0, 623	-	100	43, 87
在 WFI 中的 ABT-874 60mg/mL 1	0, 834	-	100	58, 75
在 WFI 中的 ABT-874 60mg/mL 2	0, 781	-	100	55, 02
在 WFI 中的 ABT-874 60mg/mL 3	0, 778	-	100	54, 76
在 WFI 中的 ABT-874 70mg/mL 1	1, 103	-	100	77, 69
在 WFI 中的 ABT-874 70mg/mL 2	1, 102	-	100	77, 62
在 WFI 中的 ABT-874 70mg/mL 3	1, 110	-	100	78, 13
在 WFI 中的 ABT-874 80mg/mL 1	0, 671	-	200	94, 45
在 WFI 中的 ABT-874 80mg/mL 2	0, 746	-	200	105, 06

在 WFI 中的 ABT-874 80mg/mL 3	0, 664	-	200	93, 45
在 WFI 中的 ABT-874 90mg/mL 1	0, 826	-	200	116, 37
在 WFI 中的 ABT-874 90mg/mL 2	0, 809	-	200	113, 92
在 WFI 中的 ABT-874 90mg/mL 3	0, 804	-	200	113, 27
在 WFI 中的 ABT-874 100mg/mL 1	0, 861	-	200	121, 21
在 WFI 中的 ABT-874 100mg/mL 2	0, 993	-	200	139, 80
在 WFI 中的 ABT-874 100mg/mL 3	0, 985	-	200	138, 73
在 WFI 中的 ABT-874 200mg/mL 1	0, 681	0, 805	400	226, 67
	0, 864			
	0, 869			
在 WFI 中的 ABT-874 200mg/mL 2	0, 690	0, 767	400	216, 10
	0, 828			
	0, 784			
在 WFI 中的 ABT-874 200mg/mL 3	0, 708	0, 745	400	209, 83
	0, 789			
	0, 738			

[0539] 表 14a 和 14b :浓缩过程中通过 OD280 评估的 HSA 的浓度

[0540] 表 14a

[0541]

样品名称	吸光度	稀释	浓度
在 WFI 中的 HSA 10mg/mL	0, 515	20	9, 88
在 WFI 中的 HSA 30mg/mL 1	0, 398	60	22, 94
在 WFI 中的 HSA 30mg/mL 2	0, 395	60	22, 73
在 WFI 中的 HSA 30mg/mL 3	0, 400	60	23, 00
在 WFI 中的 HSA 40mg/mL 1	0, 383	100	36, 78

在 WFI 中的 HSA 40mg/mL 2	0, 389	100	37, 33
在 WFI 中的 HSA 40mg/mL 3	0, 368	100	35, 29
在 WFI 中的 HSA 50mg/mL 1	0, 479	100	45, 97
在 WFI 中的 HSA 50mg/mL 2	0, 496	100	47, 61
在 WFI 中的 HSA 50mg/mL 3	0, 465	100	44, 61
在 WFI 中的 HSA 60mg/mL 1	0, 609	100	58, 47
在 WFI 中的 HSA 60mg/mL 2	0, 653	100	62, 69
在 WFI 中的 HSA 60mg/mL 3	0, 568	100	54, 52
在 WFI 中的 HSA 70mg/mL 1	0, 645	100	61, 89
在 WFI 中的 HSA 70mg/mL 2	0, 623	100	59, 76
在 WFI 中的 HSA 70mg/mL 3	0, 618	100	59, 28
在 WFI 中的 HSA 80mg/mL 1	0, 393	200	75, 37
在 WFI 中的 HSA 80mg/mL 2	0, 436	200	83, 69
在 WFI 中的 HSA 80mg/mL 3	0, 363	200	69, 67
在 WFI 中的 HSA 90mg/mL 1	0, 484	200	92, 90
在 WFI 中的 HSA 90mg/mL 2	0, 439	200	84, 22
在 WFI 中的 HSA 90mg/mL 3	0, 419	200	80, 50
在 WFI 中的 HSA 100mg/mL 1	0, 604	200	115, 93
在 WFI 中的 HSA 100mg/mL 2	0, 573	200	110, 00
在 WFI 中的 HSA 100mg/mL 3	0, 585	200	112, 30

[0542] 表 14b

[0543]

样品名称	吸光度	平均值	稀释	浓度
在 WFI 中的 HSA 180mg/mL 1	0, 946	0, 952	200	182, 79

	0,950			
	0,961			
在 WFI 中的 HSA 180mg/mL 2	0,994	0,929	200	178,24
	0,906			
	0,886			
在 WFI 中的 HSA 180mg/mL 3	0,843	0,896	200	172,05
	0,963			
	0,884			

[0544] 在评价的浓度范围内（即  $> 200\text{mg/mL}$  的阿达木单抗和 J695,  $> 175\text{mg/mL}$  的 HSA），评价的所有 3 种蛋白保持可溶。没有观察到不溶的迹象，例如，在溶液中出现浑浊现象或沉淀。对于阿达木单抗，结果表明，在评价的浓度范围，所有阿达木单抗同种型（即赖氨酸变体）保持可溶，因为根本没有发生沉淀。该发现也与在实施例 11 中所述的离子交换色谱数据一致，后者表明，无论阿达木单抗浓度，赖氨酸变体的总和实际上保持一致。

[0545] 实施例 7：高蛋白制剂的分析——粘度

[0546] 7.1：阿达木单抗粘度

[0547] 测得阿达木单抗（约  $50\text{mg/mL}$ ）在注射用水中的粘度是约  $1.5\text{--}2\text{mPas}$ 。对于在 WFI 中的阿达木单抗（约  $200\text{mg/mL}$ ），测得 2 个值。用来自 Malvern 的锥体 / 平板电流计（Gemini 150）测得的一个值是约  $6\text{--}6.5\text{mPas}$ ，而另一个值（用来自 Anton Paar 的锥体 / 平板电流计 MCR 301 测得）是约  $12\text{mPas}$ 。

[0548] 阿达木单抗商业制剂（约  $194\text{mg/mL}$ ）粘度：

[0549] K——毛细管常数

[0550] t——溶液穿过毛细管所需的时间 [s]

[0551] v——运动学粘度

[0552]  $\eta$  ——动力学粘度

[0553]  $\rho$  ——密度

[0554]

时间 [s]	K [mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	v [mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
279,36	0,03159	8,825	1,05475	9,31

[0555] 用来自 Anton Paar 的粘度计测得在 WFI 中的阿达木单抗（约  $200\text{mg/mL}$ ）的粘度是约  $12\text{mPas}$ ，用来自 Malvern 的粘度计测得粘度是约  $6\text{mPas}$ 。相反，商业制剂中的阿达木单抗（约  $194\text{mg/mL}$ ）的粘度更高，是  $9.308\text{mPas}$ （用来自 Schott 的毛细管粘度计测量）。

[0556] 7.2：人血清白蛋白粘度

[0557] HSA 商业制剂 (约 200mg/mL) 粘度 :

[0558] K——毛细管常数

[0559] t——溶液穿过毛细管所需的时间 [s]

[0560] v——运动学粘度

[0561]  $\eta$  ——动力学粘度

[0562]  $\rho$  ——密度

[0563]

时间 [s]	K[mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	v[mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
337.69	0.01024	3,46	1,05475	3,66

[0564] 在 WFI 中的 HSA (约 180mg/mL) 的粘度 :

[0565] K——毛细管常数

[0566] t——溶液穿过毛细管所需的时间 [s]

[0567] v——运动学粘度

[0568]  $\eta$  ——动力学粘度

[0569]  $\rho$  ——密度

[0570]

时间 [s]	K[mm <sup>2</sup> /s <sup>2</sup> ]	v[mm <sup>2</sup> /s]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$\eta$ [mPas]
185.3	0.09573	17.72	1,07905	19,12

[0571] 测得在 WFI 中的 HSA (约 180mg/mL) 的粘度是约 19.121mPas。测得在商业制剂中的 HSA (约 194mg/mL) 的粘度是 9.308mPas (用来自 Schott 的毛细管粘度计测量)。

[0572] 7.3 :阿达木单抗和 HSA 的粘度的分析

[0573] 在 WFI 中的阿达木单抗 50mg/mL 的动力学粘度分别低于在 WFI 中和在商业缓冲液中的阿达木单抗 200mg/mL 的粘度。对于 HSA, 在 WFI 中的浓度 180mg/mL 的动力学粘度是在商业缓冲液中的浓度 200mg/mL 的约 6 倍。因而, 由纯水作为溶解介质产生的效应导致的粘度变化 (即分别是增加和降低) 的强度似乎可能依赖于各种蛋白。

[0574] 实施例 8 :高蛋白制剂的流体动力学直径的分析 - 光子相关光谱学 (PCS)

[0575] 下述实施例提供了使用本发明的 DF/UF 方法得到的水制剂中的不同蛋白的流体动力学直径 ( $D_h$ ) (平均流体动力学分子直径的 z- 平均值) 的分析。

[0576] 8.1 :阿达木单抗流体动力学直径

[0577] 如图 5 和 6 所示, 观察到流体动力学直径 ( $D_h$ ) 随着阿达木单抗浓度的增加而增加的趋势。图 5 显示了流体动力学直径 (z- 平均值) 和 WFI 中的阿达木单抗浓度之间的关联。图 6 显示了流体动力学直径 (峰单体) 和 WFI 中的阿达木单抗浓度之间的关联。

[0578] 因为在流体动力学直径测量的标准操作程序 (SOP) 中作出的假设, 从 23.27mg/mL 样品与 34.20mg/mL 样品测得的  $D_h$  之间存在差异。对于具有  $\leq 23.27$ mg/mL 浓度的阿达木单抗样品, 使用假定样品粘度为 1.1mPas 值的 SOP 进行 PCS 测量。对于具有  $\geq 34.20$ mPas 的阿达木单抗样品, 使用假定 1.9mPas 样品粘度的 SOP。已知 PCS 数据受到样品溶液的给定粘度的强烈影响, 因为 PCS 数据是基于样品试样的随机布朗运动, 后者受到样品粘度的影

响。因而,可以解释流体动力学直径随着蛋白浓度的增加而增加,因为蛋白浓度的增加会增加溶液的粘度(更高的粘度导致更低的布朗运动和更高的计算  $D_h$  数据)。蛋白分子经历更低的随机布朗运动,因而,对于给定的粘度,计算出的样品试样的流体动力学直径更高。总之,基于  $z$ -平均值的  $D_h$  值和单体的  $D_h$  值非常匹配。另外,随着浓度的增加,没有观察到指示蛋白不溶性的  $D_h$  增加(即高分子量聚集体和沉淀(如果存在的话)会诱发  $D_h$  的实质性增加)。

#### [0579] 8.2 :J695 流体动力学直径

[0580] 图 7 和 8 表明,在达到 114.52mg/mL 浓度之前,J695 的流体动力学直径相对独立于蛋白浓度。使 J695 浓度从 114.52mg/mL 增加至 133.25mg/mL,会诱发  $D_h$  的快速增加。在 217.53mg/mL 浓度的流体动力学直径高于在 114.52mg/mL 时。该发现不是令人惊奇的,因为使用相同的 SOP(假定相同的粘度 1.9mPas)测量两种蛋白溶液,此时实际上粘度随着蛋白浓度增加而增加。从 114.52mg/mL 至 133.25mg/mL 的大幅增加因而可以解释为假象。

#### [0581] 8.3 :人血清白蛋白流体动力学直径

[0582] 发现 HSA 在 WFI 中的流体动力学直径随着浓度从 9.88mg/mL 升高至 112.74mg/mL 而降低。但是,从 112.74mg/mL 至 177.69mg/mL,发现流体动力学直径增加。

[0583] HSA 显示出流体动力学直径(峰单体)随着蛋白浓度的增加而增加的一般趋势,这与基础的理论原理相一致。测量 SOP 的变化(从假定粘度 1.1mPas 切换至假定粘度 1.9mPas),造成从 9.88mg/mL 至 22.89mg/mL 的  $D_h$  降低。

[0584] 在附录 A 中提供了描述上述内容的数值数据。

#### [0585] 实施例 9 :J695 :赋形剂对流体动力学直径的影响

[0586] 已经发现了令人惊奇的结果,即蛋白可以以高浓度溶于纯水中,评价了在肠胃外制剂中常用的可离子化和非可离子化赋形剂对流体动力学直径的影响。J695 用作模型蛋白。

[0587] 表 15 表明,溶液重量摩尔渗透压浓度与氯化钠的浓度成正比例。蛋白溶液的重量摩尔渗透压浓度与 NaCl 浓度一起升高(几乎线性相关)。令人感兴趣地,J695 蛋白的流体动力学直径随着盐浓度的增加而增加。NaCl 是一种离子型赋形剂,会离解成带正电荷的钠离子和带负电荷的氯离子,其可能吸附在蛋白表面。不存在盐时,J695 的流体动力学直径显著低于 J695 的通常预期值(通常测得 10nm 左右的值)。

[0588] 如表 15 所示,重量摩尔渗透压浓度随着蛋白溶液中甘露醇浓度的增加而线性增加。相反,流体动力学直径没有表现出对甘露醇浓度的依赖性。甘露醇是非离子型糖醇/多元醇。甘露醇或多元醇用作肠胃外制剂开发过程中和最终制剂中的稳定剂。甘露醇通过优先排斥来稳定化蛋白。作为其它渗透物,甘露醇被优先从蛋白表面排斥,它在蛋白水合物壳的外面。因而,折叠状态的蛋白被稳定化,因为具有更大表面的未折叠状态变得热动力学上不太有利(Foster, T.M., Thermal instability of low molecular weight urokinase during heat treatment. III. Effect of salts, sugars and Tween 80, 134 International Journal of Pharmaceutics 193(1996); Singh, S. and Singh, J., Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme, 4 AAPS PharmSciTech, Article 42(2003))。但是,令人感兴趣地,可以基本根据需要地调节重量摩尔渗透压浓度——这是本文所述蛋白发现的一个重要特征——而不影

响蛋白的  $D_h$ 。这些发现可以用于高浓度蛋白制剂,其中可能存在粘度相关的生产和给药问题,因为甘露醇对重量摩尔渗透压浓度的调节没有被蛋白  $D_h$  的增加所反映(这意味着预见到粘度保持恒定)。

[0589] 表 15 :赋形剂对 J695 重量摩尔渗透压浓度和 Z-平均值的影响

[0590]

NaCl 浓度 [mg/mL]	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	Z-平均值 [nm]
0	16	4,19
2	92	12,2
4	158	16,2
6	230	17

[0591]

甘露醇浓度 [mg/mL]	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	Z-平均值 [nm]
0	16	4,19
20	148	5,49
40	276	3,22
60	432	3,54

[0592] 实施例 10 :用尺寸排阻色谱 (SEC) 分析高蛋白制剂

[0593] 对于 SEC 分析,在注射之前,将阿达木单抗、J695 和 HSA 的样品稀释至 2mg/mL。阿达木单抗的注射体积是 20  $\mu$ L。对于 J695 和 HSA,使用 10  $\mu$ L 注射体积。

[0594] 10.1 :阿达木单抗的 SEC 分析

[0595] 当从 9.35mg/mL 浓缩至 206.63mg/mL 时,阿达木单抗单体的量从 99.4% 轻微减少至 98.8%。分别地,单体的减少与当从 23.27mg/mL 浓缩至 206.62mg/mL 时阿达木单抗溶液中聚集体的量从 0.4% 增加至 1.1% 有关。片段的量保持恒定在 0.1%,独立于蛋白浓度(参见附录 B 中的表)。因而,阿达木单抗在 WFI 中是稳定的。

[0596] 总之,认为随着蛋白浓度增加而增加的蛋白聚集仅仅是微小的。当在缓冲系统中配制蛋白时和当加入额外的表面活性剂时,预见到类似的单体减少的趋势。当在纯水中配制时,阿达木单抗蛋白表现得令人惊奇的稳定。

[0597] 10.2 :J695 的 SEC 分析

[0598] 随着蛋白浓度从 9.99mg/mL 增加至 217.53mg/mL, J695 单体的量从 99.4% 轻微减少至 98.6%。单体的减少与蛋白浓度从 9.99mg/mL 增加至 217.53mg/mL 时聚集体从约 0.4% 增加至约 1.2% 有关。独立于蛋白浓度,随着蛋白浓度从 9.99mg/mL 增加至 217.53mg/mL,片段的量几乎恒定在 0.17% 至 0.23%。

[0599] 总之,认为随着蛋白浓度增加而增加的蛋白聚集仅仅是微小的。当在缓冲系统中配制蛋白时和当加入额外的表面活性剂时,预见到类似的单体减少的趋势。因而,当在纯水中配制时, J695 蛋白表现得令人惊奇的稳定。

[0600] 10.3 :HSA 的 SEC 分析

[0601] 当从 9.88mg/ml 浓缩至 112.74mg/mL 时,单体 HSA 的量从 95.9% 减少至 92.75%。

对于 177.69mg/mL 的样品,测得最高达 94.5% 的单体增加。当从 9.88mg/mL 浓缩至 112.74mg/mL 时,蛋白聚集体从 4.1% 增加至 7.25%,单体的量随着减少。因而,当在纯水中配制时,HSA 蛋白也表现得稳定。

[0602] 在附录 B 中提供了描述上述 SEC 实验的数值数据。

[0603] 实施例 11:高蛋白制剂的分析——离子交换色谱(IEC)

[0604] 对于 IEC 分析,在注射之前,将阿达木单抗、J695 和 HSA 的样品稀释至 1mg/mL。所有蛋白的注射体积是 100  $\mu$ L。

[0605] 11.1:阿达木单抗的 IEC 分析

[0606] 如图 9 所示,阿达木单抗在 WFI 中是稳定的。图 9 显示了一个轻微的趋势,这可以解释为表明,赖氨酸变体(赖氨酸 0,1 和 2)的总和随着 WFI 中阿达木单抗浓度的增加而减少。总之,但是,赖氨酸变体的百分比变化小于 0.25%。

[0607] 11.2:J695 的 IEC 分析

[0608] 图 10 表明,J695 峰 1-7 的总和随着 J695 浓度的增加轻微减少。随着峰 1-7 的减少,酸性和碱性峰的总和轻微增加,酸性峰的增加稍更明显一些(参见图 11 和 12)。酸性峰的总和从约 10.2% 轻微增加至 10.6%,碱性峰的总和从 0.52% 轻微增加至 0.59%。

[0609] 总之,可以认为,通过 IEC,没有观察到 J695 制剂在纯水中的重大不稳定性效应或不溶性效应。

[0610] 在附录 C 中提供了描述上述 IEC 实验的数值数据。

[0611] 实施例 2-11 中的发现的总结

[0612] 最初认为,将蛋白例如抗体转移进 WFI,通过浓缩蛋白超过它在纯水中的溶解度极限,可能诱发蛋白沉淀。上面的研究表明,蛋白,包括抗体,不仅可以在低浓度转移进纯的 WFI 而不遇到任何沉淀现象和溶解度极限,而且令人惊奇地,使用 UF/DF 和离心技术(例如,TFE 装置,Vivaspin 装置),可以在纯水中将阿达木单抗(以及其它两种实验蛋白)浓缩至超过 200mg/mL 的超高浓度。另外,当在 WFI 中配制蛋白时,意外地发现实质地减少了阿达木单抗乳色。监视重量摩尔渗透压浓度,以确保阿达木单抗缓冲介质被纯的、无盐的水(即 WFI)彻底交换。此外,在用于分析的样品制备过程中,进行冷冻-融化操作,实际上用 SEC 和 IEC 分析没有观察到不稳定性现象。

[0613] 在 WFI 中在高浓度配制蛋白例如阿达木单抗的方案揭示了降低粘度现象的潜力,后者经常直接妨碍高蛋白浓度的药物制剂开发。

[0614] 最后,发现阿达木单抗在 WFI 中的流体动力学直径(通过光子相关光谱学 PCS 测得)显著低于在商业缓冲液中(指示更低的粘度倾向性)。

[0615] 总之,得出的结论是,抗体和球状模型蛋白 HSA 可以以超高浓度溶于纯水中的发现,具有提供对基本蛋白规律的新洞察和潜在提供蛋白药物配制和生产的新方案的潜力,例如,通过:

[0616] ●减少高度浓缩的蛋白制剂的乳色

[0617] ●减少高度浓缩的蛋白制剂的粘度

[0618] ●通过加入非离子型赋形剂例如甘露醇,而不改变特征例如粘度和无乳色(关于 J695,已经证实,当加入甘露醇时,流体动力学直径和乳色不会变化,但是当加入 NaCl 时会急剧增加),实现根据需要调节蛋白-WFI 溶液的重量摩尔渗透压浓度

[0619] ●提供药品配制和加工的新范例,已经证实,可以对蛋白进行 DF/UF 等操作,在 WFI 中将蛋白浓缩至超高浓度,和冷冻和融化,而不实质上牵连稳定性。在众所周知在 DF/UF 过程中,尤其在加工成高浓度的过程中,蛋白制剂的组成必然变化 (Stoner, M. 等人, Protein-solute interactions affect the outcome of ultrafiltration/diafiltration operations, 93 J. Pharm. Sci. 2332 (2004)) 的背景下,通过在纯水中 DF/UF 蛋白来调节药品浓度,和随后在高 DS 浓度加入赋形剂,可以有益地应用这些新发现 (通过这样做,避免在处理单元操作过程中 DS 制剂变化的风险)。或者,在最终的药物制剂填充-完工过程中,将赋形剂加入药品。

[0620] 实施例 12 :在水制剂中的阿达木单抗的制备

[0621] 下述实施例解释了 DF/UF 程序的放大,大规模生产在水中的阿达木单抗。

[0622] 12.1 :过程参数的评价

[0623] 在实验室规模进行渗析过程评价研究,以确定适合在含有其它赋形剂例如甘露醇和氯化钠的磷酸盐 / 柠檬酸盐缓冲系统中配制的本体阿达木单抗药物溶液的渗析的参数 (图 13 和 14)。

[0624] 可以用适合蛋白溶液的电导率分析的任意可商业得到的电导率计进行电导率测量,例如电导率计 Model SevenMulti,其具有广 pH 范围的扩展能力 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)。根据生产商的说明书,操作该仪器 (例如,如果 Mettler Toledo 仪器中的电导率传感器改变,必须再次进行校正,因为每个传感器具有不同的电池常数;参见 Model SevenMulti 电导率计的操作说明书)。如果遵守说明书,可以通过将测量探头直接浸入样品溶液来进行电导率测量。

[0625] 图 13 显示了渗析程序的效率,按导致含有 74mg/ml 的阿达木单抗的制剂的重量摩尔渗透压浓度和电导率的组分的减少来表示。抗体溶液中的溶质减少至 1/100 后,重量摩尔渗透压浓度和电导率测量值主要稳定在远低于来自商业制剂的这些参数的起始测量值的水平。

[0626] 图 14 显示了渗析的阿达木单抗本体溶液的 pH 稳定性。显示出具有许多不同起始 pH 读数的阿达木单抗溶液相对于去离子水渗析 (1 : 1,000,000) 之前和之后的 pH 水平。在渗析之前和之后,渗余物中的 pH 水平几乎保持相同。

[0627] 12.2 :生产在水本体药物溶液中的高度浓缩的阿达木单抗

[0628] 在第一步中,通过超滤 / 渗滤至约 100mg/ml 的浓度 (12L 规模, Millipore Pellicon 2Mini Bio-A MWC0 10k 柱),向上浓缩配制的本体药物溶液 (含有其它赋形剂例如甘露醇和氯化钠的磷酸盐 / 柠檬酸盐缓冲系统)。在第二步中,相对于去离子水渗析向上浓缩的溶液 (SpectraPor7 MWC0 10k, 稀释倍数 1 : 100,000)。作为第三步,使用 Millipore Pellicon 2Mini Bio-A MWC0 10k 柱,通过超滤 / 渗滤至约 250mg/ml 的浓度,向上浓缩渗析的溶液。

[0629] 表 16a 显示了程序的步骤 3 后在水中高度浓缩的阿达木单抗 (DF/UF 处理过的) 本体药物溶液的分析结果。

[0630] 表 16a :DF/UF 本体处理过的阿达木单抗的重量摩尔渗透压浓度和电导率数据

[0631]

重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 conc mg/ml
<b>62</b>	<b>0.95</b>	<b>5.28</b>	<b>1.0764</b>	<b>277.8</b>

[0632] 12.3:模拟生产条件的冷冻/融化(F/T)程序

[0633] 使用超低温冷冻机(Revco Ultima II, 20cu. ft.)进行冷冻,生产规模负载47kg液体在低于-50℃、通常-70℃至-80℃的温度冷冻。将液体包装在1.6kg填充重量的各个瓶子中(例如,Nalgene 2L PETG 正方形介质)。48小时后结束冷冻。在循环水浴(例如,Lindergh/Blue)中进行融化,生产规模负载24kg,在20℃至40℃、通常30℃的温度,直到材料完全融化。

[0634] 12.4:冷冻和融化过程中的瓶子作图(mapping)

[0635] 分离并分析瓶子体积中的各个水平溶液层。在250mg/ml和200mg/ml的蛋白浓度,在阿达木单抗水溶液中仅检测到微小的梯度形成,如图15至19所示。但是,在250mg/ml和200mg/ml配制的阿达木单抗溶液(使用含有其它赋形剂例如甘露醇和氯化钠的磷酸盐/柠檬酸盐缓冲系统的溶液)的冷冻和融化,导致在瓶子底部形成沉淀。

[0636] 12.5:阿达木单抗的商业和低离子型制剂中的梯度形成

[0637] 对比了阿达木单抗的商业和低离子型(水)制剂在冷冻融化程序中的梯度形成。表16b显示了冷冻/融化步骤后不同浓度的商业阿达木单抗溶液的目检结果。沉淀的形成表明,冷冻/融化程序在溶液中产生不稳定性。在100mg/ml以上,观察到显著的沉淀形成。表17显示了冷冻-融化实验之前2种50mg/ml溶液和1种100mg/ml低离子型制剂的分析数据。

[0638] 表16b:冷冻/融化后在商业阿达木单抗溶液中观察到的沉淀

[0639]

	250 mg/ml	220 mg/ml	200 mg/ml	150 mg/ml	120 mg/ml	100 mg/ml	60 mg/ml
在超低温冷冻机中的商业冷冻过程: -70℃/23℃	沉淀	沉淀	沉淀	沉淀	部分沉淀	澄清	澄清

[0640] 表17:冷冻-融化前的溶液分析数据

[0641]

	制剂	pH	密度 (g/cm <sup>3</sup> )	重量摩尔渗透压浓度 (mOsmol/kg)	蛋白浓度 (mg/mL)
E167 130 01 CL 50 mg/mL在水中的	低离子	5.18	1.0121	5	49.3
E167 140 01 CL 50 mg/mL在缓冲液中的	商业制剂	5.20	1.0224	280	48.7
100 mg/mL在水中的	低离子	5.32	1.0262	12	99.8

[0642] 将约1600mL(50mg/ml溶液)或800mL(100mg/ml溶液)的每种制剂置于PETG瓶子中,并进行常规冷冻(-80℃)融化(23℃,水浴)程序。然后从PETG瓶子的顶部、中间和底部取样,分析pH、密度、重量摩尔渗透压浓度和蛋白浓度。分析结果如表18所示。

[0643] 表 18 :来自冷冻 / 融化的溶液的瓶子作图层的分析

[0644]

样品	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	重量摩尔 渗透压浓度 mOsmol/kg	蛋白含量 (体积) mg/mL
在水中 50mg/mL				
顶部	5.20	1.0119	6	48.72
中间	5.19	1.0120	8	49.35
底部	5.17	1.0120	6	49.76
商业制剂				
顶部	5.16	1.0165	236	37.9
中间	5.13	1.0221	306	45.58
底部	5.12	1.0257	368	55.48
在水中 100mg/mL				
顶部	5.29	1.0259	13	98.7
中间	5.3	1.0262	16	99.9
底部	5.28	1.0262	14	101.2

[0645] 阿达木单抗的商业制剂在冷冻 / 融化后在密度 (指示蛋白和赋形剂的异质性 / 梯度)、重量摩尔渗透压浓度 (指示赋形剂梯度) 和蛋白含量方面表现出显著的梯度。相反, 在冷冻 / 融化后, 在 50mg/mL 低离子型阿达木单抗制剂中没有发现梯度。

[0646] 在更高的蛋白浓度, 有时可以预见到梯度形成变得恶化。但是, 在冷冻 / 融化后, 在 100mg/mL 低离子型阿达木单抗制剂中没有发现 pH、密度、重量摩尔渗透压浓度和蛋白浓度的梯度。

[0647] 实施例 13 :DF/UF 后 J695 的稳定性

[0648] 下述实施例提供了根据本发明的方法 DF/UF 处理后 J695 的稳定性数据。

[0649] 在 pH 调节后或在渗滤后, 分析了 J695 在正常 DS 缓冲液中的蛋白样品。用 0.1M 磷酸将 pH 调节至 pH 4.4, 蛋白浓度 112mg/mL。对于在 WFI 中浓缩的样品, 使用配有 30kDa RC 膜的 TFF, 在环境温度相对于水渗滤 (DF/UF) 蛋白样品约 1.5 天。测得 DF/UF 后的蛋白浓度是约 192mg/mL。pH 4.7。

[0650] 13.1 :尺寸排阻分析 (SEC) 实验程序

[0651] 为 J695 的纯度评估开发了尺寸排阻方法。尺寸排阻色谱 (SEC) 会根据分子量分离大分子。树脂起筛分剂的作用, 使更小的分子保留在树脂孔中, 允许更大的分子穿过柱。保留时间和分辨率随着选择的树脂的孔径而变。

[0652] 基于所述的浓度, 用纯化水 (Milli-Q) 将每个样品稀释至 2.5mg/mL。将 50 μg 每种样品一式两份地注射进柱。Tosoh Bioscience G3000swx1, 7.8mm x 30cm, 5 μm (目录号 08541) SEC 柱用于分离。对于缓冲液 A, 使用 211mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0。在 280nm 和 214nm 进行检测。使柱保持在室温, 流速是 0.3mL/min。

[0653] 该色谱使用等度 (isocratic) 梯度, 使用 100% 流动相 A 溶剂, 持续 50 分钟。

[0654] 13.2 :SEC 数据

[0655] 表 19 描述了尺寸排阻色谱实验的数据。

[0656] 表 19 :J695 参照标准品、DS 和 DF/UF 后 (在水中) 的 SEC 分析数据

[0657]

<b>ABT-874</b>					
	负载	HM	单体	片段	
<b>BF 参照标准品</b>	<b>50u</b>	<b>0.49</b>	<b>97.9</b>	<b>1.28</b>	<b>0.26</b>
<b>BF 参照标准品副本</b>	<b>50u</b>	<b>0.41</b>	<b>98.0</b>	<b>1.29</b>	<b>0.27</b>
<b>BF 参照标准品平均值</b>		<b>0.45</b>	<b>98.0</b>	<b>1.29</b>	<b>0.27</b>
<b>std</b>		<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>%RS</b>		<b>12.5</b>	<b>0.05</b>	<b>0.55</b>	<b>2.67</b>
<b>在缓冲液中的 DS PH4.4</b>	<b>50u</b>	<b>0.42</b>	<b>98.3</b>	<b>1.04</b>	<b>0.16</b>
<b>在缓冲液中的 DS PH4.4 副本</b>	<b>50u</b>	<b>0.40</b>	<b>98.4</b>	<b>1.01</b>	<b>0.13</b>
<b>在缓冲液中的 DS PH4.4 平均值</b>		<b>0.41</b>	<b>98.4</b>	<b>1.03</b>	<b>0.15</b>
<b>std</b>		<b>0.01</b>	<b>0.06</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>
<b>%RS</b>		<b>3.45</b>	<b>0.06</b>	<b>2.07</b>	<b>14.6</b>
<b>在水中的 UF/DF 的 DS PH4.7</b>	<b>50u</b>	<b>0.69</b>	<b>98.1</b>	<b>1.04</b>	<b>0.14</b>
<b>在水中的 UF/DF PH4.7 副本</b>	<b>50u</b>	<b>0.69</b>	<b>98.0</b>	<b>1.07</b>	<b>0.16</b>
<b>在水中的 UF/DF 的 DS PH4.7 平均值</b>		<b>0.69</b>	<b>98.1</b>	<b>1.06</b>	<b>0.15</b>
<b>std</b>		<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>
<b>%RS</b>		<b>0.00</b>	<b>0.04</b>	<b>2.01</b>	<b>9.43</b>

[0658] 13.3 :SEC 分析结论

[0659] 表 19 中的数据表明, J695 的商业制剂 (DS PFS, pH = 4.4) 具有与 J695 参照标准品相当水平的片段和聚集体。商业制剂 J695 对照品和已经经历 DF/UF, 在水中的 J695 (在 H<sub>2</sub>O 中的 DS, pH = 4.7, 192mg/ml) 之间存在聚集体量的差异 :看到聚集体从 0.4% 增加至 0.7%。这不是显著的增加, 可能是由于在 UF/DF 过程中在室温耗费的时间。片段没有变化。

[0660] 13.4 :IEC(WCX-10) 实验程序

[0661] 使用 Dionex WCX-10 柱, 为 J695 异质性的评估开发了阳离子交换方法。一般而言, 阳离子交换色谱根据表观等电点和与树脂的表面电荷相互作用来分离蛋白同种型。在特定的低盐起始条件下, 目标蛋白会结合到柱上, 通过梯度增加盐浓度, 从柱洗脱。具有越低表观等电点的蛋白与阳离子交换柱的结合越不紧密, 首先被洗脱, 具有越高表观等电点的蛋白结合越紧, 最后被洗脱。

[0662] 使用 WCX-10 的阳离子交换色谱在质量控制中用作批量释放试验。修改试验条件来改善已知 J695 同种型的分离。

[0663] 用纯化水 (Milli-Q) 将样品稀释至 1.0mg/mL。一式三份地操作参照标准品作为对比, 在纯化水 (Milli-Q) 中稀释至 1mg/ml。

[0664] Dionex Propac WCX-10 柱 (p/n 054993), 以及对应的保护柱 (p/n054994), 用于分离。在该程序中使用的缓冲液包括缓冲液 A (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 6.0) 和缓冲液 B (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500mM NaCl, pH = 6.0)。柱温度维持在 35°C, 柱流速是 1mL/min。100 μg 负载的注射体积是 100 μl, 在 280nm 进行检测。在表 20 中提供了色谱分离过程中的缓冲液梯度。

[0665] 表 20 :在 J695 的 IEC 分析中使用的缓冲液梯度

[0666]

时间 (分)	% MPA	% MPB

0	75	25
3	60	40
33	40	60
36	0	100
41	0	100
43	75	25
48	75	25

[0667] 13.5 :IEC 数据

[0668] 表 21 提供了实验结果,其中对比了 J695 参照标准品和在商业缓冲液中的 J695 (DS pH = 4.4), 并对比了商业缓冲制剂和 DF/UF (DF/UF H<sub>2</sub>O, pH = 4.7) 之后的 J695。

[0669] 表 21 :J695 参照标准品、商业制剂 (DS) 和 DF/UF 后的 (在水中) IEC 数据

[0670]

	0glu(1)	0glu(2+2a)	1glu(3)	1glu(4)	1glu(5)+(5a)	2glu(6)	2glu(7)	酸性	碱性
参照标准品	43.77	7.55	8.00	21.87	4.28	4.82	3.75	4.05	1.92
参照标准品副本	43.49	7.49	7.98	21.70	4.26	4.81	3.75	4.61	1.90
参照标准品副本	43.44	7.49	8.00	21.65	4.24	4.81	3.74	4.75	1.89
参照标准品平均值	43.57	7.51	7.99	21.74	4.26	4.81	3.75	4.47	1.90
SD	0.20	0.04	0.01	0.12	0.01	0.01	0.00	0.40	0.01
% RSD	0.45	0.56	0.18	0.55	0.33	0.15	0.00	8.86	0.74

[0671]

	0glu(1)	0glu(2+2a)	1glu(3)	1glu(4)	1glu(5)+(5a)	2glu(6)	2glu(7)	酸性	碱性
ABT-B74DS pH = 4.4	35.65	14.74	7.26	18.06	6.76	5.32	3.98	5.55	2.70
ABT-874DS pH = 4.4 副本	35.82	14.73	7.29	18.14	6.82	5.39	4.06	4.79	2.95
ABT-874DS pH = 4.4 平均值	35.74	14.74	7.28	18.10	6.79	5.36	4.02	5.17	2.83
SD	0.12	0.01	0.02	0.06	0.04	0.05	0.06	0.54	0.18
% RSD	0.34	0.05	0.29	0.31	0.62	0.92	1.41	10.39	6.26

[0672]

	0glu(1)	0glu(2+2a)	1glu(3)	1glu(4)	1glu(5)+(5a)	2glu(6)	2glu(7)	酸性	碱性
ABT-874DF/UF H <sub>2</sub> O pH = 4.7	36.57	14.51	7.26	18.09	6.57	5.22	3.91	5.28	2.61
ABT-874DF/UF H <sub>2</sub> O pH = 4.7 副本	36.60	14.43	7.25	18.02	6.66	5.18	4.00	5.31	2.56
ABT-874DF/UF H <sub>2</sub> O pH = 4.7	36.59	14.47	7.26	18.06	6.62	5.20	3.96	5.30	2.59

SD	0.02	0.06	0.01	0.05	0.06	0.03	0.06	0.02	0.04
% RSD	0.06	0.39	0.10	0.27	0.96	0.54	1.61	0.40	1.37

[0673] 13.6 :IEC 分析结论

[0674] 注意到 J695 参照标准品和商业制剂 (DS, pH 4.4) 之间存在一些差异。在开始运行 DS 工程运行样品时注意到这些差异,将它们归因于 3000L 和 6000L 活动之间的生产过程的差异。DS、pH 4.4 对照和在 H<sub>2</sub>O 中的 J695、pH = 4.7、192mg/ml 样品之间没有显著差异。

[0675] 实施例 14 :DF/UF 和在 2-8°C 长期储存后阿达木单抗的稳定性

[0676] 下述实施例提供的数据证实了在 2-8°C 储存 22.5 个月后根据本发明的方法的水制剂中的阿达木单抗的稳定性。

[0677] 相对于水渗滤用于 SEC 和 WCX-10 分析的阿达木单抗样品,浓缩至约 177mg/mL。储存样品,并在不同的时间点分析稳定性。

[0678] 在商业 Humira 缓冲液中的标准阿达木单抗溶液 (DS, pH 约 5.2) 用作在水中生产浓缩溶液的原料。使用配有 30kDa RC 膜的 TFF,在环境温度相对于水渗滤 (DF/UF) 蛋白溶液样品约 1.5 天。测得 DF/UF 后的蛋白浓度是约 177mg/mL, pH 5.2。分析之前,在 2-8°C 储存样品 22.5 个月。

[0679] 14.1 :SEC 实验程序

[0680] 以前开发了尺寸排阻方法用于检查抗体片段和聚集体的存在。尺寸排阻色谱 (SEC) 会根据分子量分离大分子。树脂起筛分剂的作用,使更小的分子保留在树脂孔中,允许更大的分子穿过柱。保留时间和分辨率随着选择的树脂的孔径而变。

[0681] 用 milli Q 水将每个样品稀释至 1.0mg/mL,将 50 μg 每种样品注射进柱。对于 SE-HPLC,使用 Sephadex 200 柱 (Pharmacia 目录号 175175-01, S/N 0504057) 或 TSK 凝胶 G3000SW (目录号 08541 ;用于分析 22.5 个月的样品)。柱的流动相包含 20mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠, pH 7.5。在 280nm 和 214nm 进行检测。将柱保持在环境温度,流速是 0.5mL/min (Sephadex 柱) 或 0.3mL/min (TSK 柱)。

[0682] 14.2 :SEC 数据

[0683] 图 20 和表 22 含有作为液体在 2-8°C 储存 8.5 个月的低离子型阿达木单抗溶液与在 -80°C 储存的相同溶液相比的分析结果。表 23 含有在 2-8°C 储存 22.5 个月的低离子型阿达木单抗溶液与阿达木单抗的参照标准品样品相比的分析数据。

[0684] 表 22 :对比冷冻储存的阿达木单抗和长期冷冻储存的阿达木单抗的 SEC 分析数据

[0685]

样品	负载	%HMW	%单体	%LMW
相对水DF/UF, 177mg/ml, -80°C 4.5个月	50 μg	0.1	99.6	0.3
相对水DF/UF, 177mg/ml, 2-8°C 9个月	50 μg	0.2	99.5	0.3

[0686] 表 23 :对比阿达木单抗参照标准品和长期冷冻储存的阿达木单抗的 SEC 分析数据

[0687]

样品	负载	%HMW	%单体	%LMW
参照标准品, 阿达木单抗	50 $\mu$ g	0.31	98.85	0.84
相对水DF/UF, 177mg/ml, 2-8 $^{\circ}$ C 22.5个月	50 $\mu$ g	1.42	97.59	0.98

[0688] 从表 22 可见, SEC 分析表明,甚至在 2-8 $^{\circ}$ C 9 个月后或在 -80 $^{\circ}$ C 4.5 个月后,在水中的阿达木单抗是稳定的,聚集体百分比(% HMW) 和片段百分比(% LMW) 在整个时间中微量。

[0689] 14.3 :SEC 分析结论

[0690] 在 2-8 $^{\circ}$ C 储存 8.5 个月后,阿达木单抗溶液(相对水 DF/UF) 显示出小部分的高分子量(HMW) 物质(0.2%) 和小部分的片段(0.3%)。在 -80 $^{\circ}$ C 储存 4.5 个月和随后的融化(水浴,23 $^{\circ}$ C) 没有影响阿达木单抗稳定性(0.1% 聚集体,0.3% 片段)。

[0691] 在 2-8 $^{\circ}$ C 储存 22.5 个月的样品的分析也显示与阿达木单抗参照标准品相当的片段含量(表 23)。但是,在 22.5 个月稳定性样品中检测到的聚集体水平(1.66%) 稍微高于在参照标准品中检测到的聚集体水平。

[0692] 已知抗体的自联高度依赖于抗体浓度,即非共价聚集体和联合复合物的形成在高蛋白浓度是最显著的。该自联是可逆的,缓冲溶液稀释会导致减少的自联趋势(Liu, J. 等人,94Journal of Pharmaceutical Sciences 1928(2004))。

[0693] 因而,样品制备的差异和阿达木单抗溶液稀释(从 177mg/mL 至 1mg/mL) 和随后的 SEC 样品分析之间的不同延迟时间,可能是 8.5 个月和 9 个月稳定性样品的聚集体含量差异的原因。

[0694] 14.4 :IEC 实验程序

[0695] 使用 Dionex WCX-10 柱,为抗体电荷异质性的评估开发了阳离子交换方法。阳离子交换色谱根据表观等电点和与树脂的表面电荷相互作用来分离蛋白同种型。在特定的低盐起始条件下,目标蛋白会结合到柱上,通过梯度增加盐浓度,可以从柱洗脱。具有越低表观等电点的蛋白与阳离子交换柱的结合越不紧密,首先被洗脱,具有越高表观等电点的蛋白结合越紧,最后被洗脱。

[0696] 操作之前,用 milli Q 水稀释样品至 1.0mg/mL。Dionex Propac WCX-10 柱(p/n 054993),以及对应的保护柱(p/n 05499),用于分离。准备 2 种流动相缓冲液,10mM 磷酸钠,pH 7.5(缓冲液 A) 和 10mM 磷酸钠,500mM 氯化钠,pH 5.5(缓冲液 B)。使柱保持在环境温度,流速是 1.0mL/min。100  $\mu$ g 负载的注射体积是 100  $\mu$ l,在 280nm 进行检测。在表 24 中提供了色谱分离过程中的缓冲液梯度。

[0697] 表 24 :在阿达木单抗的 IEC 分析中使用的缓冲液梯度

[0698]

时间(分)	% MPA	% MPB
0.05	94	6

20	84	16
22	0	100
26	0	100
28	94	6
34	94	6
35	94	6

[0699] 14.5 :离子交换数据

[0700] 表 25 显示了储存之前阿达木单抗参照标准品、商业制剂 (150mg/ml) 和 DF/UF 后低离子溶液的离子交换色谱数据。表 26 显示了在 2-8℃ 储存 22.5 个月后参照标准品与低离子溶液相比的数据。

[0701] 表 25 :阿达木单抗参照标准品、DS/ 商业制剂和 DF/UF 后 (在水中) 的 IEC 分析数据

[0702]

样品名称	% 酸性区域1	% 酸性区域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
阿达木单抗参照标准品	2.69	11.66	60.77	19.42	5.40
阿达木单抗 DS 150mg/ml	2.51	11.38	62.05	19.14	4.83
相对水渗滤过的阿达木单抗, 177mg/ml	2.26	11.81	61.97	18.51	4.73

[0703] 表 26 :对比参照标准品和长期冷冻储存的 DF/UF 样品的 IEC 分析数据

[0704]

样品名称	% 酸性区域1	% 酸性区域2	% 0 Lys	% 1 Lys	% 2 Lys
阿达木单抗参照标准品	2.1	10.9	63.8	18.4	4.6
相对水 DF/UF 的阿达木单抗, 177mg/ml, 2-8℃ 22.5 个月	2.7	13.4	62	16.7	4.1

[0705] 14.6 :离子交换分析结论

[0706] 对于 T0 样品, 数据表明, 参照标准品阿达木单抗、商业制剂阿达木单抗 (用作 DS 来通过 DF/UF 将阿达木单抗配入水中), 相对于水渗滤, 并浓缩至 177mg/ml 的阿达木单抗之间的酸性区域 1、2、0Lys、1Lys 或 2Lys 百分比没有显著差异 (即, 电荷异质性) (表 25)。

[0707] 另外, 储存 177mg/mL 在水中的阿达木单抗样品 22.5 个月后, 当与阿达木单抗参照标准品相比时, 可以看到 0Lys、1Lys 和 2Lys 级分的仅轻微差异。总之, 当通过 DF/UF 处理将阿达木单抗配制进水并在 177mg/mL 的浓度在 2-8℃ 储存 22.5 个月时, 没有观察到显著的化学不稳定性趋势。

[0708] 实施例 15 :低离子型 1D4.7 溶液的冷冻 / 融化稳定性

[0709] 证实了通过渗析 (使用 slide-a-lyzer 盒,根据生产商的说明书使用, Pierce, Rockford, IL) 配制进水中的 1D4.7 蛋白 (一种免疫球蛋白 G1) 抗 -IL12/ 抗 -IL23 在 2mg/mL 浓度、pH 6 在重复的冷冻 / 融化 (f/t) 处理 (-80°C /25°C 水浴) 过程中是稳定的。将数据与常规制剂 (2mg/mL, pH 6) 相对比,发现在水中配制的 1D4.7 的稳定性超过在常规筛选的缓冲系统 (例如 20mM 组氨酸, 20mM 甘氨酸, 10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 中配制的 1D4.7 的稳定性,甚至超过基于通用缓冲液 (10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 的 1D4.7 制剂的稳定性,所述通用缓冲液含有许多常用于蛋白制剂中的赋形剂,例如 10mg/mL 甘露醇, 10mg/mL 山梨醇, 10mg/mL 蔗糖, 0.01% 聚山梨醇酯 80, 20mM NaCl。

[0710] 进行 SEC、DLS 和颗粒计数来监视蛋白稳定性,使用具有 1-200  $\mu\text{m}$  测量范围的颗粒计数系统 (例如颗粒计数器 Model Syringe, Markus Klotz GmbH, Bad Liebenzell, 德国), 进行颗粒计数。实验细节如下:

[0711] ● 将在水中配制的 1D4.7 与上面列出的制剂相对比

[0712] ● 应用 4 个冷冻 / 融化循环

[0713] ● 30mL PETG 容器,约 25mL 填充, 2mg/mL, pH 6

[0714] ● 在 T0、T1 (即 1 个冷冻 / 融化步骤后)、T2、T3 和 T4 取样

[0715] ● 分析:目检, SEC, DLS, 在显微镜下才能看得见的颗粒测量

[0716] 图 21 显示了在重复的冷冻 / 融化循环 (-80°C /25°C) 过程中的 1D4.7 稳定性,这通过  $> 1 \mu\text{m}$  的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。将 1D4.7 配制在通用缓冲液 (10mM 柠檬酸盐, 10mM 磷酸盐) 中,然后测试下述赋形剂变化:山梨醇 (10mg/mL), 甘露醇 (10mg/mL), 蔗糖 (10mg/mL), NaCl (100mM), 和聚山梨醇酯 80 (0.01%)。也在水中配制 1D4.7 (通过渗析), 根本不加入赋形剂。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试,以评价材料处理、冷冻 / 融化和取样对颗粒负载的潜在影响。

[0717] 在冷冻 / 融化后在水中配制的 1D4.7 的稳定性超过用蛋白制剂常用的赋形剂配制的 1D4.7 溶液的稳定性。已知甘露醇、蔗糖和山梨醇可用作冻干保护剂和 / 或冷冻保护剂,聚山梨醇酯 80 是普遍已知在暴露于疏水 - 亲水界面 (例如空气 - 水和冰 - 水) 后会增加蛋白的物理稳定性的非离子型赋形剂。因而,当用采用的其它方法 (例如 SEC, 目检, 等) 分析时,在水中配制的 1D4.7 溶液表现得稳定。

[0718] 实施例 16 :低离子型 13C5.5 抗体溶液的冷冻 / 融化稳定性

[0719] 证实了在水中配制的 13C5.5 抗 IL-13 蛋白在 2mg/mL 浓度、pH 6 在重复的冷冻 / 融化处理 (-80°C /25°C 水浴) 过程中是稳定的。将数据与常规制剂 (2mg/mL, pH 6) 相对比,发现在水中配制的 13C5.5 的稳定性超过在常规筛选的缓冲系统 (例如 20mM 组氨酸, 20mM 甘氨酸, 10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 中配制的 13C5.5 的稳定性,甚至超过基于通用缓冲液 (10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 的 13C5.5 制剂的稳定性,所述通用缓冲液含有许多常用于蛋白制剂中的赋形剂 (例如 10mg/mL 甘露醇, 10mg/mL 山梨醇, 10mg/mL 蔗糖, 0.01% 聚山梨醇酯 80, 20mM NaCl, 200mM NaCl)。

[0720] 以与实施例 15 关于 1D4.7 所述相同的方式,进行样品制备、实验处理、取样和样品分析。

[0721] ● 将在水中配制的 13C5.5 与上面列出的制剂相对比

[0722] ●应用 4 个冷冻 / 融化循环

[0723] ● 30mL PETG 容器

[0724] ● 2mg/mL, pH 6

[0725] ●在 T0、T1、T2、T3 和 T4 取样

[0726] ●分析:目检, SEC, DLS, 在显微镜下才能看得见的颗粒测量

[0727] 图 22 显示了在重复的冷冻 / 融化循环 (-80°C / 25°C) 过程中的 13C5.5 稳定性, 这通过 > 10 μm 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。将 13C5.5 配制在 10mM 磷酸盐缓冲液、10mM 柠檬酸盐缓冲液、20mM 甘氨酸缓冲液和 20mM 组氨酸缓冲液中。也在水中配制 13C5.5 (通过渗析), 根本不加入赋形剂。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试, 以评价材料处理、冷冻 / 融化和取样对颗粒负载的潜在影响 (空白)。

[0728] 在冷冻 / 融化后在水中配制的 13C5.5 的稳定性超过在蛋白制剂常用的缓冲液中配制的 13C5.5 溶液的稳定性。用采用的其它分析方法 (例如 SEC, 目检, 等) 没有观察到在水中配制的 13C5.5 溶液的不稳定性。

[0729] 图 23 显示了在重复的冷冻 / 融化循环 (-80°C / 25°C) 过程中的 13C5.5 稳定性, 这通过 > 1 μm 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。将 13C5.5 配制在通用缓冲液 (10mM 柠檬酸盐, 10mM 磷酸盐) 中, 然后测试下述赋形剂变化: 山梨醇 (10mg/mL), 甘露醇 (10mg/mL), 蔗糖 (10mg/mL), NaCl (200mM), NaCl (20mM) 和聚山梨醇酯 80 (0.01%)。也在水中配制 13C5.5 (通过渗析), 根本不加入赋形剂, 作为对比 (纯水)。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试, 以评价材料处理、冷冻 / 融化和取样对颗粒负载的潜在影响。

[0730] 在冷冻 / 融化后在水中配制的 13C5.5 的稳定性超过用蛋白制剂常用的赋形剂配制的 13C5.5 溶液的稳定性。已知甘露醇、蔗糖和山梨醇可用作冻干保护剂和 / 或冷冻保护剂, 聚山梨醇酯 80 是普遍已知在暴露于疏水 - 亲水界面 (例如空气 - 水和冰 - 水) 后会增加蛋白的物理稳定性的非离子型赋形剂。

[0731] 用采用的其它分析方法 (例如 SEC, 目检, 等) 没有观察到在水中配制的 13C5.5 溶液的不稳定性。

[0732] 如上所述进行冷冻 / 融化程序后 13C5.5 溶液的 DLS 分析。仅 1 个冷冻 / 融化步骤后, 含有 0.01% 吐温 -80 的 13C5.5 溶液含有显著的高分子量 (HMW) 聚集体形式, 而在水中的 13C5.5 不含有 HMW 聚集体形式, 甚至在 3 个冷冻 / 融化步骤后。

[0733] 实施例 17: 溶液 pH 对 WFI 中的阿达木单抗的影响

[0734] 进行下述实验来确定溶液 pH 对在 WFI 中配制的高度浓缩的阿达木单抗的物理化学特征的影响。测试下述浓度: 2mg/mL, 50mg/mL, 100mg/mL, 150mg/mL, 200mg/mL, 和 250mg/mL。

[0735] 材料

[0736] ●阿达木单抗药品 (DS), 商业材料

[0737] ● 25°C 水浴 (循环) 用于融化

[0738] ●渗滤装置: Sartorius Sartocoon Slice, 膜: PES 50kD, 1000cm<sup>2</sup>

[0739] ●渗滤装置: Millipore Labscale™ TFF 系统, 膜: PLCK 30kD, 再生的纤维素, 大

小 :50cm<sup>2</sup>

- [0740] ● Eppendorf 离心机 5810R
- [0741] ● Amicon Ultra-15 容器用于离心, Ultracel-30k, 再生的纤维素 30,000MWC0
- [0742] ● Millex GV 0.22 μm, Millipore 用于样品的无菌过滤
- [0743] ● 样品容器 (Eppendorf 样品容器 1.5mL, Roth 冷冻管 5mL, PETG 瓶子 125mL)

[0744] 分析:

- [0745] ● 使用 Biothrode 进行 pH 测量
- [0746] ● 密度测量
- [0747] ● 重量摩尔渗透压浓度测量
- [0748] ● UV/VIS 分光光度计用于蛋白浓度测量
- [0749] ● 光子相关光谱学 (PCS)
- [0750] ● 粘度测量
- [0751] ● 浊度测量
- [0752] ● 尺寸排阻色谱 (SEC)
- [0753] ● 傅里叶变换中红外光谱学 (FT-M-IR)

[0754] 17.1 阿达木单抗商业制剂的 DF/UF 的准备概要

[0755] 将阿达木单抗 DS 溶液 (120mg/mL) 分成 7 个体积部分, 分别用 0.25N NaOH 和 0.25N HCl 将它们调节至 pH3、pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9。然后, 用各个 pH 的阿达木单抗缓冲液稀释样品至 100mg/mL。溶液显示轻微的浑浊, 后者在无菌过滤 (0.22 μm, PVDF 无菌过滤器) 后消失。稀释后, 再次监视 pH 值 (参见下面表 27)。

[0756] 从每个溶液取 100mg/mL 溶液的下述样品:

- [0757] ● 4mL 用于浊度和随后的 ζ 电位测量
- [0758] ● 1mL 用于粘度测量 (使用下落球粘度计)
- [0759] ● 0.15mL 用于重量摩尔渗透压浓度测量
- [0760] ● 2mL 用于密度测量
- [0761] ● 0.15mL 用于 PCS (测量时考虑样品粘度)
- [0762] ● 1mL 用于 FT-M-IR
- [0763] ● 2mL 用于粘度和静态光散射测量

[0764] 冷冻 (-80°C) 用于 ζ 电位、粘度和静态光散射测量的样品。使用注射用水作为交换介质, 对 pH 4、pH 5、pH 6、pH 7、和 pH 8 溶液的剩余体积进行连续模式渗滤。首先在 -80°C 冷冻样品。在 DF/UF 之前, 在 Julabo 水浴中在 25°C 融化样品。

[0765] 17.2 DF/UF 和浓缩程序

[0766] 对浓度为 100mg/ml、pH 水平为 4、5、6、7 和 8 的在商业制剂中的阿达木单抗溶液进行 DF/UF 处理, 进一步在离心机中用 UF 进行浓缩过程。该部分描述了 pH 6 阿达木单抗溶液的处理作为一个实例。其它溶液的处理以类似方式进行。

[0767] 在 25°C 在水浴中融化阿达木单抗溶液 (100mg/mL, pH 6), 然后均质化。然后, 通过应用下述参数, 使用注射用水作为交换介质, 使用 TFF 装置 M. P. 33.4 对溶液进行渗滤:

- [0768] ● 搅拌器 : 速度 2
- [0769] ● 泵 : 速度 1

- [0770] ●上流 / 入口压力 :2-2.4bar
- [0771] ●下流 / 出口压力 :0.6-0.8bar
- [0772] ●膜 :再生的纤维素,截止 30kD
- [0773] ●连续模式 DF/UF
- [0774] ●在 DF/UF 操作过程中应用约 6 倍体积交换
- [0775] 应用 6 体积交换步骤后,通过 OD280,光度计 M. P. 9. 7,测定阿达木单抗的浓度。检查渗透物和渗余物的重量摩尔渗透压浓度。
- [0776] 浓度 :125.1mg/mL
- [0777] 渗透物重量摩尔渗透压浓度 :57mOsmol/kg
- [0778] 渗余物重量摩尔渗透压浓度 :12mOsmol/kg
- [0779] 用注射用水将 DF 后在水中的阿达木单抗溶液稀释至 100mg/mL,并无菌过滤。DF/UF 处理后,从 100mg/mL 溶液取下述样品 :
- [0780] ●4mL 用于浊度和随后的  $\zeta$  电位测量
- [0781] ●1mL 用于粘度测量
- [0782] ●0.15mL 用于重量摩尔渗透压浓度测量
- [0783] ●2mL 用于密度测量
- [0784] ●0.15mL 用于 PCS(测量过程中考虑粘度)
- [0785] ●0.15mL 用于 SEC
- [0786] ●pH- 测量
- [0787] ●1mL 用于 FT-M-IR
- [0788] ●2mL 用于粘度和静态光散射测量
- [0789] 用注射用水稀释一部分 100mg/mL 阿达木单抗溶液,产生 50mg/mL 和 2mg/mL 溶液。从两份溶液取下述样品 :
- [0790] ●4mL 用于浊度和随后的  $\zeta$  电位测量
- [0791] ●2mL 用于粘度测量
- [0792] ●0.15mL 用于重量摩尔渗透压浓度测量
- [0793] ●2mL 用于密度测量
- [0794] ●0.15mL 用于 PCS(考虑粘度)
- [0795] ●pH- 测量
- [0796] 使用离心,对在水中的阿达木单抗溶液 (pH 6,100mg/mL) 进行浓缩实验。用 Eppendorf 离心机 (5810R M. P. 33. 57) 进行离心。在 4000rpm 应用每个离心步骤 15min。此后,通过轻轻颠倒旋转,使在离心浓缩装置中的样品溶液均质化,从而使溶液均质化,由此避免在紧挨膜的区域形成凝胶。浓缩过程中的温度是 15℃。离心进行至约 250mg/mL。通过测量 OD280,光度计 M. P. 9. 7,测定浓度。然后,将阿达木单抗溶液稀释至 250mg/mL、200mg/mL 和 150mg/mL 的浓度。
- [0797] 浓缩程序后和稀释的每个单个步骤后,取下述样品。从 250mg/mL 和 150mg/mL 溶液取的样品体积是 :
- [0798] ●2mL 用于粘度测量
- [0799] ●0.15mL 用于 PCS(考虑粘度)

[0800] ● 0.15mL 用于重量摩尔渗透压浓度测量

[0801] ● 0.15mL 用于 SEC

[0802] ● pH- 测量

[0803] 从 200mg/mL 溶液取的样品体积是：

[0804] ● 4mL 用于浊度和随后的  $\zeta$  电位测量

[0805] ● 1mL 用于粘度测量

[0806] ● 0.15mL 用于重量摩尔渗透压浓度测量

[0807] ● 2mL 用于密度测量

[0808] ● 0.15mL 用于 PCS (考虑粘度)

[0809] ● 0.15mL 用于 SEC

[0810] ● pH- 测量

[0811] ● 2mL 用于要在 ABC 进行的分析工作 (粘度和静态光散射测量)

[0812] 在每个 pH 值, 在水中的阿达木单抗溶液的浓缩处理停留在约 250mg/mL, 因为在更高的浓度, 尤其在接近 pI (对于阿达木单抗, 约 pH 8.5) 的 pH 值, 在水中的阿达木单抗溶液的粘度急剧增加 (达到凝胶形成的粘度)。

[0813] 17.3 阿达木单抗溶液的目检

[0814] DF/UF 和浓缩至 250mg/mL 后, 与在缓冲液中的阿达木单抗溶液 (商业制剂) 相比, 在水中的阿达木单抗溶液在各个 pH 显示更少的乳色。所有在水中的阿达木单抗溶液在每个 pH 值显示为澄清溶液。稀释后, 没有阿达木单抗溶液显示乳色。总之, 在浓缩和稀释程序中, 在水中的阿达木单抗溶液没有观察到沉淀。

[0815] 17.4 粘度

[0816] 在各个浓度进行粘度测量, 考虑 pH 5 阿达木单抗溶液的密度。使用下落球粘度计。使用毛细管粘度计测量高于 200mPa\*s 的粘度。

[0817] 图 24 提供了在不同浓度 (2mg/mL 至 250mg/mL, 在 50mg/mL 浓缩步骤中) 的 pH 从 4 至 8 的在水中的阿达木单抗溶液的粘度数据概要。溶液 pH、浓度和粘度之间存在清楚的关联。粘度随着蛋白浓度的增加而增加, 独立于溶液 pH。在接近阿达木单抗的 pI 的溶液 pH 值 (即 pH 7 和 pH 8), 溶液粘度的增加最显著, 尤其在更高的蛋白浓度 (即 200mg/mL, 250mg/mL)。

[0818] 17.5 浊度

[0819] 从图 25 可见, 从浊度数据发现了相同的趋势 (即, 浊度随着浓度增加和 pH 增加而增加)。在浊度测量之前, 无菌过滤 (0.22  $\mu$ m) 所有样品。

[0820] 17.6 流体动力学直径 (PCS)

[0821] 在每个浓度, 在每个 pH 值, 进行 PCS 测量, 考虑每个样品的粘度。测量在 200mg/mL 和 250mg/mL 的溶液, 但是在 Zetasizer nano 系列 (Malvern Instruments) 装置测试参数外, 结果没有分析来自这些测量的数据。

[0822] 与在商业制剂中配制的阿达木单抗 ( $D_n$  约 7nm) 相比, 当在水中配制阿达木单抗时 ( $D_n$  约 2nm, 50mg/mL, pH 5), 发现流体动力学直径 ( $D_n$ ) 显著减小。图 26 解释了 PCS 数据 (也参见表 39)。在下面的 17.11 部分也显示了对应的数据表。

[0823] 如图 26 所示, 对于 pH 值为 4、5 和 6 的溶液, 阿达木单抗单体的  $D_n$  随着蛋白浓度的

增加而恒定减小。相反,随着浓度从 2mg/mL 增加至 50mg/mL,具有更接近阿达木单抗的 pI 的 pH 值(即在 pH 7 和 pH 8)的溶液表现出  $D_h$  的显著增加。但是,随着在 pH 7 和 8 溶液中浓度升高至超过 50mg/mL,  $D_h$  减小。在 150mg/mL 的浓度,所有溶液具有比 2mg/mL 的对应 pH 溶液更低的  $D_h$  值。图 27 显示了不同浓度的 pH 5 溶液的  $D_h$  尺寸分布。图 28 显示了在水中配制的 5 种阿达木单抗溶液的  $D_h$  尺寸分布,各自具有 100mg/mL 蛋白浓度和不同的 pH 值。图 29 显示的数据类似于图 28 的数据,例外是,在缓冲液中配制 5 种阿达木单抗溶液。

[0824] 17.7pH- 测量

[0825] 使用水进行 DF/UF 之前和之后(即分别针对在缓冲液中和在水中配制的阿达木单抗进行),在 100mg/mL 测量溶液 pH。表 27 显示了结果。在 DF/UF 之前和之后, pH 值恒定维持在 pH 5、pH 6 和 pH 7。溶液 pH 没有因为介质变化而变化。使用水 DF/UF 后,在 pH 4 的 pH 值轻微增加,在 pH 8 的 pH 值轻微减小。

[0826] 表 27 :使用水 DF/UF 之前和之后的 pH 值

[0827]

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
在缓冲液中的阿达木单抗 100mg/mL	4.00	4.99	6.00	7.03	8.00
在水中的阿达木单抗 100mg/mL	4.29	4.98	5.98	7.02	7.67

[0828] 17.8 重量摩尔渗透压浓度测量

[0829] 在 pH 5 溶液样品的 DF/UF 过程中,在每个体积交换步骤后(即,100mL 渗透物后,200mL 渗透物后,等)测量溶液重量摩尔渗透压浓度,以核实 5- 倍体积交换是否足以使重量摩尔渗透压浓度降低至低于 15mOsmol/kg 的值。表 28 显示了结果。

[0830] 表 28 :使用水进行 DF/UF 过程中的重量摩尔渗透压浓度变化, pH5 溶液

[0831]

体积交换步骤, mL	渗余物 mOsmol/kg	渗透物 mOsmol/kg
100	96	166
200	28	115
300	29	89
400	12	67
500	15	49

[0832] 在 pH 4、pH 6、pH 7 和 pH 8,仅在 DF/UF 处理结束时测量重量摩尔渗透压浓度。表 29 显示了每个 pH 的重量摩尔渗透压浓度结果(以 mOsmol/kg 单位计算)。

[0833] 表 29 :使用水进行 DF/UF 之前和之后在不同 pH 值的重量摩尔渗透压浓度

[0834]

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
在缓冲液中的阿达木单抗 100mg/mL	287	298	297	286	279
在水中的阿达木单抗 100mg/mL	40	13	11	5	5

[0835] 用冰点粘度计进行重量摩尔渗透压浓度测量。

[0836] 17.9 断裂 (SEC)

[0837] SEC 数据显示, pH4 溶液中的蛋白在整个浓度范围 (100-250mg/mL) 有相对明显的断裂,而在 pH5-8 在相同浓度范围几乎没有检测到断裂。因此, pH 4 溶液的单体含量相应减少 (图 30)。发现聚集体值随着 pH 值增加 (从 pH 4 至 pH 8) 而增加,独立于浓度 (图 31)。

[0838] 17.10 结论

[0839] 该实验用于检查溶液 pH 和蛋白浓度对通过 DF/UF 处理在水中配制的阿达木单抗溶液的粘度和  $D_h$  (流体动力学直径) 的影响。这样的溶液称作低离子溶液。评价了 pH 4-8 的范围,测试的蛋白浓度在 2-250mg/mL 之间。

[0840] 关于粘度 (部分 17.4),发现低离子型阿达木单抗溶液具有与在离子 (即离子型赋形剂例如有机缓冲剂组分或盐) 存在下配制的阿达木单抗溶液相同的特征:

[0841] ● 蛋白浓度越高,溶液粘度越高。对于具有更接近阿达木单抗 pI 的 pH 值 (即, pH 7 和 pH 8) 的溶液,该浓度 - 粘度关联更明显。相反,对于恒定浓度的溶液,粘度与溶液 pH 值和阿达木单抗 pI 之间的接近度有关。

[0842] 关于 DLS 数据 (部分 17.6),可以得出下述结论:

[0843] ● 发现通过低离子型阿达木单抗溶液的 DLS 测得的阿达木单抗  $D_h$  值低于在阿达木单抗商业制剂中测量的  $D_h$  值,尤其在非常低的溶液 pH。

[0844] ● 溶液 pH 越低,通过 DLS 测得的  $D_h$  值越低。

[0845] ● 蛋白浓度越高,给定 pH 的低离子型阿达木单抗溶液中的  $D_h$  值越低。

[0846] 该行为的解释是,蛋白溶液的离子强度 (即离子和可离子化赋形剂的存在) 对于蛋白 - 蛋白相互作用的程度是至关重要的。特别在越低的溶液 pH,低离子型阿达木单抗溶液中的电荷 - 电荷斥力越明显。当在 DF/UF 处理中使用水作为交换介质在水中配制蛋白时,存在的可以组成 Helmholtz 层和 Gouy-Chapman 层的可离子化反荷离子的量显著减少。结果,分子间电荷 - 电荷相互作用 (由于在蛋白表面存在的氨基酸残基的电荷) 可能比具有丰富的可离子化反荷离子 (例如可离子化赋形剂) 的环境更明显,蛋白单体之间的电荷 - 电荷斥力 (在电荷 - 电荷斥力的情况下,导致分子运动) 和随机的布朗运动促成通过 DLS 测得的蛋白分子的迁移 / 运动。在 DLS 实验中,将更大的分子迁移翻译成更大的分子扩散系数,通常使用 Stokes-Einstein 方程将其分配给具有更小的流体动力学大小的分子。这可以解释为什么低离子制剂中蛋白的流体动力学直径减小。

[0847] 抗体分子之间的电荷 - 电荷相互作用可以是排斥的 (在更低的溶液 pH) 和吸引的 (在更高的接近蛋白 pI 的溶液 pH)。

[0848] 17.11 数据表

[0849] 表 30:

[0850]

相对水DF之前在缓冲液中的阿达木单抗100mg/ml							
	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9
浊度 (NTU)	9,9	15,4	28,5	36,3	45,0	48,4	46,5
粘度 (mPa*s)	2,5197	2,7935	3,2062	3,1512	3,5116	3,5494	3,5844
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	2,4366	2,6991	3,0969	3,0444	3,3893	3,4261	3,4589
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1,0341	1,0350	1,0353	1,0351	1,0361	1,0360	1,0363
渗透压浓度 (mOsmol/kg)	293	287	298	297	286	279	285
Z-Ave d (nm) PCS	4,3	4,3	6,0	7,3	7,7	8,0	7,8

[0851]

pH	4,00	4,99	6,00	7,03	8,00	9,03
----	------	------	------	------	------	------

[0852] 表 31 :

[0853]

相对水DF之后，浓缩之前，用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH4 2mg/mL	pH4 50mg/mL	pH4 100.5mg/mL
浊度 (NTU)	0,296	1,46	3,30
粘度 (mPa*s)	0,9653	1,4471	2,2411
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	0,9665	1,4298	2,1834
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)			40
Z-Ave d (nm) PCS	3,37	2,24	1,81
pH			4,29
浓缩之后和用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH4 150.5mg/mL	pH4 219.0mg/mL	pH4 251.8mg/mL
浊度 (NTU)		3,56	
粘度 (mPa*s)	4,0283	13,,304	48,642
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	3,8712	12,614	45,567
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	64	96	141
Z-Ave d (nm) PCS	1,32	0,458	0,162
pH	4,32		4,54
相对水DF之后，浓缩之前，用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH5 2mg/mL	pH5 50mg/mL	pH5 97.5mg/mL
浊度 (NTU)	0,02	1,66	3,54
粘度 (mPa*s)	1,0563	1,6664	2,8661
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,0576	1,6465	2,7924
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0,9988	1,0121	1,0264
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)			13
Z-Ave d (nm) PCS	157	32,4	1,3
pH	4,55	4,83	4,98
浓缩之后和用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH5 150.7mg/mL	pH5 200.2mg/mL	pH5 253.0mg/mL
浊度 (NTU)		7,24	
粘度 (mPa*s)	7,0866	19,539	79,272
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	6,8102	18,525	74,26
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1,0406	1,0547	1,0675
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	78	80	96
Z-Ave d (nm) PCS	0,727	0,335	0,255
pH	5,03	5,05	5,08

[0854] 表 32 :

[0855]

相对水DF之后，浓缩之前，用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH6 2mg/mL	pH6 50mg/mL	pH6 100mg/mL
浊度 (NTU)	0,458	2,24	2,95
粘度 (mPa*s)	1,0696	1,8003	3,1147
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,0708	1,7789	3,0385
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0,9989	1,012	1,0251
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	3+11=14:2=7	27	11
Z-Ave d (nm) PCS	30,8	2,78	2,48
pH	5,72	5,95	5,98

[0856] 表 33 :

[0857]

浓缩之后和用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH6 146.6mg/mL	pH6 201.8mg/mL	pH6 248.5mg/mL
浊度 (NTU)		9,29	
粘度 (mPa*s)	9,0193	32,352	126,06
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	8,6775	30,709	118,07
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	1,0394	1,0535	1,0677
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	37	58	95
Z-Ave d (nm) PCS	0,989	0,355	0,108
pH	5,92	6,05	6,03

[0858] 表 34 :

[0859]

相对水DF之后，浓缩之前，用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH7 2mg/mL	pH7 50mg/mL	pH7 103.2mg/mL
浊度 (NTU)	0,1	7,13	14,9
粘度 (mPa*s)	1,1252	1,6898	4,2257
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,1268	1,6688	4,1146
密度 (g/cm <sup>3</sup> )	0,9986	1,0126	1,027
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	0	2	5
Z-Ave d (nm) PCS	3,31	4,16	2,89
pH	6,63	6,93	7,02

[0860] 表 35 :

[0861]

浓缩之后和用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH7 143.0mg/mL	pH7 203.4mg/mL	pH7 251.7mg/mL
浊度 (NTU)		19,3	
粘度 (mPa*s)	14,024	74,987	343,881
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	13,492	70,928	321,144
密度 (g/cm <sup>3</sup> )		1,0571	1,0708
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)	65	106	160
Z-Ave d (nm) PCS	1,27	0,346	0,0876
pH	6,9	7,01	7,2

[0862] 表 36 :

[0863]

相对水DF之后, 浓缩之前, 用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH8 2mg/mL	pH8 50mg/mL	pH8 96.1mg/mL
浊度 (NTU)	0,41	12,10	28,300
粘度 (mPa*s)	1,261	1,8444	4,3486
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	1,2625	1,8224	4,2368
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)			5
Z-Ave d (nm) PCS	5,59	5,62	4,28
pH			7,67

[0864] 表 37 :

[0865]

浓缩之后和用水稀释至以下的阿达木单抗			
	pH8 148.5mg/mL	pH8 200.6mg/mL	pH8 230.7mg/mL
浊度 (NTU)		32,5	
粘度 (mPa*s)	20,102	85,5	233,14
粘度 (mm <sup>2</sup> /s)	19,318	81,066	218,04
密度 (g/cm <sup>3</sup> )			
重量摩尔 渗透压浓度 (mOsmol/kg)			
Z-Ave d (nm) PCS	1,42	0,398	0,168
pH		7,6	

[0866] 表 38 :

[0867]

PCS数据: 在缓冲液中的阿达木单抗

	Z-Ave d.nm	PDI	Pk1 d.nm	Pk1 区域%	Pk2 d.nm	Pk2 区域%	Pk3 d.nm	Pk3 区域%
pH 3 100 mg/mL	4,23	0,283	4,43	86,4	54,1	13,6	0	0
pH 4 100 mg/mL	4,3	0,101	4,81	100	0	0	0	0
pH 5 100 mg/mL	6,01	0,065	6,5	100	0	0	0	0
pH 6 100mg/mL	7,25	0,063	7,82	100	0	0	0	0
pH 7 100 mg/mL	7,64	0,094	8,53	100	0	0	0	0
pH 8 100 mg/mL	7,95	0,099	8,88	100	0	0	0	0
pH 9 100 mg/mL	7,7	0,133	8,98	100	0	0	0	0

[0868] 表 39 :

[0869]

PCS数据: 在水中的阿达木单抗

	Z-Ave d.nm	PDI	Pk1 d.nm	Pk1 区域%	Pk2 d.nm	Pk2 区域%	Pk3 d.nm	Pk3 区域%
pH 4 2 mg/ml	3,37	0,219	3,39	88,8	73,3	11,2	0	0
pH 4 50 mg/ml	2,24	0,194	2,65	97,7	3300	2,3	0	0
pH 4 100,5 mg/ml	1,81	0,172	2,02	97,4	3390	2,6	0	0
pH 4 150,5 mg/ml	1,32	0,181	1,64	100	0	0	0	0
pH 4 219,0 mg/ml	0,458	0,217	4070	62	0,621	38	0	0
pH 4 251,8 mg/ml	0,162	0,263	0	0	0	0	0	0
pH 5 2 mg/ml	157	0,468	1,88	84,3	181	10,7	17	5
pH 5 50 mg/ml	32,4	0,17	1,6	87,7	15,5	4,8	186	4,7
pH 5 97,4 mg/ml	1,32	0,183	1,52	97,4	3290	2,6	0	0
pH 5 150,7 mg/ml	0,931	0,209	1,36	98,7	3710	1,3	0	0
pH 5 200,2 mg/ml	0,335	0,203	0	0	0	0	0	0
pH 5 253,0 mg/ml	0,107	0,255	0	0	0	0	0	0
pH 6 2 mg/ml	30,8	0,382	2,78	60,9	273	30,2	5070	5
pH 6 50 mg/ml	2,78	0,247	2,68	86,4	1600	7,8	114	5,8
pH 6 100 mg/ml	2,01	0,171	2,48	100	0	0	0	0
pH 6 146,6 mg/ml	0,989	0,219	1,32	96,9	3770	301	0	0
pH 6 201,8 mg/ml	0,355	0,231	0	0	0	0	0	0
pH 6 248,5 mg/ml	0,108	0,301	0	0	0	0	0	0
pH 7 2 mg/ml	3,31	0,211	3,58	93,9	1250	6,1	0	0
pH 7 50 mg/ml	4,16	0,132	4,84	100	0	0	0	0
pH 7 103,2 mg/ml	2,89	0,141	3,39	100	0	0	0	0
pH 7 143,3 mg/ml	1,27	0,212	1,68	100	0	0	0	0
pH 7 203,4 mg/ml	0,346	0,306	0	0	0	0	0	0
pH 7 251,7 mg/ml	0,0876	0,497	0	0	0	0	0	0
pH 8 2 mg/ml	5,59	0,365	3,15	67,4	244	30,2	26,5	2,4
pH 8 50 mg/ml	5,62	0,174	7	100	0	0	0	0
pH 8 96,1 mg/ml	4,28	0,192	4,81	96,9	3640	3,1	0	0
pH 8 148,5 mg/ml	1,43	0,253	1,68	93,9	2910	6,1	0	0

[0870]

pH 8	200,6 mg/ml	0,398	0,246	4920	100	0	0	0	0
pH 8	230,7 mg/ml	0,168	0,3	0	0	0	0	0	0

[0871] 表 40 :SEC 数据

[0872]

pH	浓度 mg/mL	%聚集体	%单体	%片段	区域 (mVs)
4	100	0,28	67,95	31,76	45195,348
4	150	0,26	66,07	33,68	44492,803
4	200	0,30	64,59	35,11	52558,050
4	250	0,29	64,40	35,31	48491,299
5	100	1,46	98,44	0,11	48127,249
5	150	1,33	98,56	0,11	43226,397
5	200	1,39	98,50	0,11	43634,282
5	250	1,38	98,52	0,11	41643,062
6	100	2,00	97,90	0,10	44338,373
6	150	2,52	97,37	0,11	41899,182
6	200	2,52	97,37	0,11	43869,183
6	250	2,39	97,50	0,11	34969,456
7	100	2,78	97,12	0,10	46194,824
7	150	4,24	95,65	0,11	47443,014
7	200	3,61	96,29	0,10	41916,220
7	250	3,39	96,50	0,11	38185,208
8	100	3,24	96,65	0,12	42334,491
8	150	3,64	96,18	0,18	40305,890
8	200	3,63	96,25	0,13	40280,342
8	250	3,76	96,05	0,19	32067,297

[0873] 实施例 18 :pH 对 J695 粘度的影响

[0874] 使用水作为交换介质进行 DF/UF 处理后,得到 J695 的粘度数据。应用至少 5 个 DF/UF 步骤,相对于水渗滤 J695DS(参见实施例 1)。然后使用平板-平板粘度计,100rpm 剪切率,150  $\mu$ m 间隙,60mm 平板直径(装置:Bohlin Geminim 粘度计(Malvern Instruments, Southborough, MA),评价的温度范围 8-25 $^{\circ}$ C),在不同温度测定粘度。

[0875] 如图 32 所示,分别在 179mg/mL 和 192mg/mL 的浓度, J695 溶液粘度在 12 $^{\circ}$ C 低于 70cP,在 20 $^{\circ}$ C 低于 40cP,在 25 $^{\circ}$ C 低于 30cP。

[0876] 实施例 19:纯水中抗体的药代动力学(PK)

[0877] 该研究的目的是,评价制剂参数(即含有水的低离子型蛋白制剂相对于使用离子型赋形剂例如缓冲剂和盐的常规蛋白制剂)对皮下(s. c.)施用阿非莫单抗后的局部耐受性和 PK 的潜在影响。另外,研究了制剂的全身毒性和毒物代谢动力学数据。使用的蛋白浓度从 50mg/mL 至 200mg/mL,离子强度从 3mOsm/kg 至 300mOsm/kg。

[0878] 在雄性斯普拉-道来大鼠中用阿非莫单抗(MAK 195F-小鼠抗人 TNF F(ab')<sub>2</sub>(Abbott Laboratories))进行单次(皮下)给药可行性研究,以评估皮下施用 50 和 200mg/kg 的液体制剂后大鼠中阿非莫单抗的局部耐受性和毒性。单次皮下给药后是观察/恢复时间段。进行有限的血液取样,以测量循环阿非莫单抗水平和评估吸收和半衰期。施用的剂量体积是 1mL/kg 体重。实验组包括下述:

[0879] 实验组

[0880]

- |     |                          |
|-----|--------------------------|
| 01  | 对照(载体)                   |
| 02  | 50 mg/ml 阿非莫单抗, 液体, 标准制剂 |
| 07  | 200 mg/ml 阿非莫单抗, 液体, 水制剂 |
| 组 A | 观察时间 2 天                 |
| 组 B | 观察时间 7 天                 |
| 组 C | 观察时间 14 天                |

[0881] 分组和大鼠鉴别(N = 1/组)

[0882]

组	动物数		
	组A	组B	组C
01	1	2	3
02	4	5	6
07	19	20	21

[0883] 在给药后第 1 天在 15 分钟、1、3、5 和 24 小时,重复观察动物的临床体征和死亡率,此后每天至少一次。在给药(第 1 天)和尸体剖检(分别第 3、15 或 21 天)的当天测量体重,每周 2 次(如果可行)。在第 1 天(给药后 4 小时)和第 2、3、5、8 和 15 天(如果可行)收集用于药物分析的血样。在尸体剖检之前收集血液,评价血液学的和临床的化学参数。在尸体剖检之前,制备每个动物的血涂片。在尸体剖检时,肉眼检查体腔。测量肝、肾、胸腺、脾和淋巴结的器官重量。对注射部位和肝、肾、胸腺、脾和淋巴结进行初步的组织病理学检查。

[0884] 在预定的尸体剖检之前,所有动物都在研究中存活。施用水制剂的大鼠在第 14-15

天在颈区域表现出痲。没有观察到对体重的实验项目有关的效应。血液学和临床化学值是可变的。在血液病学或临床化学中没有清楚地鉴别出实验项目有关的变化。在尿液分析中没有观察到实验项目有关的变化。器官重量的测量产生高差异性,在器官重量方面没有清楚地鉴别出实验项目有关的变化。

[0885] 在粗略观察时,在第3天在接受水制剂的大鼠中观察到注射区域皮下组织的红化。所有其它变化属于在该品系和年龄的斯普拉-道来大鼠中常见的自发现象范围。

[0886] 显微镜发现如下:

[0887] ●组 01、02 中没有发现

[0888] ●组 07 中微小的弥散性皮下炎症

[0889] ●组 07 中与粗病理学的红化有关的局部皮下出血(第3天),认为与给药有关

[0890] ● pan-T、抑制/细胞毒性 T 细胞/自然杀伤细胞、pan-B 细胞和 pan- 巨噬细胞标志物对局部反应的初步免疫组织化学结果指示主要是巨噬细胞和自然杀伤细胞参与皮下炎症/浸润。因而,到目前为止没有对使用的制剂的局部免疫原应答的暗示。

[0891] 所有其它变化属于在该品系和年龄的斯普拉-道来大鼠中常见的自发现象范围。

[0892] 皮下施用阿非莫单抗后,吸收很快,在注射后 0.2-3 天达到最大血清水平。测试的所有样品中阿非莫单抗的绝对水平都很低。在样品之间观察到很大的差异性,可能是因为有限的取样频率和使用的动物的小量。在大多数样品中,在 5-8 天后在血清中检测不出阿非莫单抗。血清水平的这种下降可能是由于  $F(ab')_2$  的高清除。大多数样品观察到的  $T_{1/2}$  是在 1-2 天范围内,这与以前的观察结果相一致。低离子型制剂的更长的半衰期(7.8 天)可能代表样品的延长吸收。数据显示在表 41 和 42 中。

[0893] 表 41 :MAK195F 的血浆暴露水平

[0894]

	时间(天)	浓度( $\mu\text{g/ml}$ )			平均值( $\mu\text{g/ml}$ )	STD
		大鼠4	大鼠5	大鼠6		
50mg/kg液体 标准制剂	0,167	1,40	1,17	1,38	1,32	0,13
	2	0,76	0,97	0,66	0,80	0,16
	3	0,45	0,67	0,47	0,53	0,12
	5		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	8		LLOQ	LLOQ	LLOQ	
	15			LLOQ	LLOQ	

	时间(天)	浓度( $\mu\text{g/ml}$ )			平均值( $\mu\text{g/ml}$ )	STD
		大鼠19	大鼠20	大鼠21		
200mg/kg水制剂	0,167	1.27	3.01	3.17	2.48	1.05
	2	0.17	1.57	1.53	1.09	0.80
	3	LLOQ	1.54	1.56	1.55	0.02
	5		0.64	0.66	0.65	0.02
	8		0.40	0.37	0.38	0.02
	15			0.25	0.25	0.00

[0895] LLOQ = 低于定量界限

[0896] 液体没有发现聚集状态,无论阿非莫单抗还是对照物质。

[0897] 对于低离子强度制剂,观察到微弱的弥散性皮下注射部位炎症。使用增加的蛋白

浓度（分别 50mg/mL 和 200mg/mL），观察到微弱至轻微或轻微至中等的炎症。观察到一些局部皮下出血，这与肉眼病理学的红化有关；认为这是注射过程中血管穿刺的结果。在水制剂的第 3 天，观察到注射部位处的一些皮下红化，但是不认为是有害的。总之，所述制剂是局部耐受的。

[0898] 在下面的表 42 中，显示了常规液体制剂与水制剂相比较的 PK 数据。

[0899] 表 42：皮下给药不同制剂后 MAK 195F 的药物代谢动力学参数。

[0900]

剂量 (mg/kg)	制剂	半衰期 (天)	Tmax (天)	Cmax (µg/ml)	AUC (天 * µg/ml)	平均停留时间 (天)	最后可检出浓度的时间 (天)	最后可检出浓度 (µg/ml)
50	液体	0.5	0.2	1.32	3.3	1.5	3	0.53
200	水制剂	5.9	0.2	2.48	11.8	7.5	15	0.25

[0901] 如表 42 所示，用低离子型制剂（即在水中配制的阿非莫单抗）观察到可检测的血清水平持续时间的增加。

[0902] 在该研究中，在低离子溶液（水）中观察到的 MAK195F 的绝对水平提供了比常规 MAK195F 液体制剂更好的暴露、更长的可检测的血清水平和“半衰期”。

[0903] 标准制剂中的阿非莫单抗半衰期是在 1-2 天范围内，这与以前 F(ab')<sub>2</sub> 分子的观察结果相一致。但是，低离子型制剂观察到看起来更长的半衰期（7.8 天）。因此，与测试的标准制剂相比，该制剂中 MAK195F 的平均停留时间显得更长。

[0904] 实施例 20：2.5(E)mg1（抗 IL-18 抗体）的 DF/UF

[0905] 使用注射用水（在下文中称作“水”），应用约 4- 倍体积交换，进行 2.5(E)mg1 本体溶液（59.6mg/mL）的渗滤 / 超滤（连续模式）。通过监视渗余物的浊度、蛋白浓度（OD280）、pH 和重量摩尔渗透压浓度、和 DLS 测量，控制 DF/UF 操作。在 DF/UF 过程中，也监视渗透物重量摩尔渗透压浓度，以控制 2.5(E)mg1 本体溶液的赋形剂减少。

[0906] 材料和方法

[0907] ● 2.5(E)mg1 本体药品（蛋氨酸，组氨酸，没有聚山梨醇酯 80）(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)：2 个装有共计 589.12g 溶液的 PETG 瓶子，溶液浓度 59.6mg/mL。

[0908] ● Ampuwa（注射用水）(Fresenius Medical Care, Waltham, MA)。

[0909] ● Millipore Labscale TFF DF/UF 单元，包括 2x Pellicon XL 过滤器盒，Millipore, PLCTK 30kDa 膜，再生的纤维素

[0910] ● UV/VIS 分光光度计，Specord 50，使用 280nm 波长

[0911] ● Metrohm pH- 计，类型 744，具有 Biotrode 探头 No. 57

[0912] ● 渗透压计：Knauer, K-7400

[0913] ● 密度测量使用 Paar 的装置，DMA 4100

[0914] ● 层流柜 Hereaus

[0915] ● 浊度测量：Hach, 2100 AN

[0916] ●粘度计 :Paar, AMVn

[0917] ●天平 :Mettler Toledo, AT261 和 33.45

[0918] ●过滤器 :Millex AP 20(纤维玻璃)和 Minisart High Flow Filter(纤维素醋酸酯), 0.20  $\mu\text{m}$  孔径。

[0919] 20.1 实验程序

[0920] 融化 2.5(E)mg/l DS 样品 :使用 23°C 的循环水浴, 在 2 小时内融化装有冷冻 DS 的 2 L PETG 瓶子。融化的 DS 是澄清的, 轻微乳色, 没有肉眼可见的颗粒。

[0921] 通过 DF/UF 浓缩 DS :由于 DF/UF 单元贮器体积限制为 530 mL, 将 2.5(E)mg/l DS 浓缩至终体积 525 mL。

[0922] 使用水(缓冲液交换)进行 DF/UF :对 DS(蛋氨酸, 组氨酸, 2.5(E)mg/l) 进行 DF/UF, 应用 4- 倍体积交换。表 43 给出了在整个实验中使用的水的量, 表 44 提供了实验参数。

[0923] 表 43 :DF/UF 水体积交换

[0924]

体积交换	使用的水体积 (累积的)
1- 倍	576 mL
2- 倍	1152 mL
3- 倍	1728 mL
4- 倍(实验结束)	2304 mL

[0925] 表 44 :DF/UF 程序参数

[0926]

Labscale TFF DF	设置
泵速	1.5-2
泵压	20-30 psi
搅拌速度	~ 3
实验时间	8 hrs

[0927] 每处理约 200 mL 渗透物, 进行渗透物的重量摩尔渗透压浓度测量。

[0928] 相对水 DF/UF 后, 2.5(E)mg/l 溶液的体积是 450 mL, 蛋白浓度是 76.6 mg/mL。然后浓缩该溶液, 其含有基本上溶于水中的 2.5(E)mg/l。

[0929] 表 45 :溶液浓缩的 DF/UF 处理参数

[0930]

Labscale TFF UF	设置
泵速	1.5-2
泵压	最大 30psi

搅拌速度	~ 3
实验持续时间	51min.
最终溶液重量：	257.83g

[0931] 对浓缩过的溶液 (~ 130mg/mL) 进行 0.2 μm 过滤。将溶液冷却至 2-8°C, 然后在 -80°C 保存。

[0932] 20.2 在 2.5(E)mg/l 的 DF/UF 过程中收集的数据

[0933] 表 46 :过程中控制数据

[0934]

DF步骤	体积 [mL]	时间	溶液温度/室温 [°C]	浊度 [NTU]	pH	重量摩尔渗透压浓度 [mOsmol/kg]	浓度 [mg/ml]
2.5(E)mg/l				14.5	5.91	150	59.6
0 <sup>1</sup>	0	08:00	19.0/24.1	N/A	5.91	125	65.2
1	575	10:02	24.4/24.4	10.1	5.92	50	70.1
2	1150	11:50	24.3/24.7	6.67	5.94	16	72.8
3	1730	13:50	25.0/24.8	6.55	5.97	6	74.6
ca. 4	2200	15:35	25.8/25.5	10.1	5.97	5	76.7

[0935] 表 47 :渗透物的重量摩尔渗透压浓度 (在过程中分离和测量)

[0936]

样品号	时间	溶液温度/室温 [°C]	渗透物 [ml]	累积渗透物 [ml]	DF/UF 步骤数	重量摩尔渗透压浓度 [mOsmol/kg]
0 <sup>3</sup>	07:35	N/A	90	N/A	N/A	125
1	08:00	19.0/24.1	200	200	0.3	124
2	08:50	23.0/24.1	200	400	0.7	82
3	09:27	24.0/24.2	200	600	1.0	53
4	10:12	24.4/24.4	200	800	1.4	37
5	10:50	24.5/24.3	200	1000	1.7	25
6	11:25	24.6/24.3	200	1200	2.1	16
7	12:10	24.7/24.3	230	1430	2.5	7
8	12:55	24.7/24.4	170	1600	2.8	4
9	13:25	24.8/24.4	200	1800	3.1	2
10	14:15	25.1/24.8	200	2000	3.5	0
11	14:55	25.8/25.5	200	2200	3.8	1

[0937] 表 48 :缓冲液交换后 2.5(E)mg/l 溶液的浓度

[0938]

时间	溶液温度 [°C]	贮器中的体积 [即, 渗余物] [ml]	pH
15:54	25.9	450	5.94
16:02	26.1	400	5.96
16:07	26.1	375	5.96
16:20	26.2	350	5.96
16:28	26.3	300	5.98
16:35	26.5	275	5.98
16:45	26.5	250	5.99

[0939] 表 49 :浓缩过的 2.5(E)mg/l 溶液的分析特征 (0.2 μm 过滤之前和之后) :

[0940]

参数	批次	
	过滤前	过滤后
浊度 [NTU]	15.4	9.58
重量摩尔渗透压浓度 [mOsmol/kg]	6	N/A
密度 [g/ml]	1.0346	N/A
pH	5.99	N/A
动力学粘度 (25 °C) [mPas]	N/A	7.9998

[0941] 表 50 :在 DF/UF 过程中的动态光散射数据 (测定单体的  $D_h$  和  $D_h$  的 z- 平均值 = 溶液中存在的所有试样的  $D_h$ )

[0942]

DLS数据	取样					
	DV 1- 倍	DV 2- 倍	DV 3- 倍	DV 4- 倍	浓缩后	过滤后
峰1 直径单体	4.32	3.68	3.54	3.48	2.03	2.13
密度 [%]	100.0	100.0	100.0	89.6	87.0	100.0
Z-平均值 [nm]	3.95	3.28	3.20	3.53	2.12	1.89
Pdl	0.077	0.106	0.094	0.245	0.287	0.113
峰2 直径 [nm]	N/A	N/A	N/A	984	411	N/A
密度 [%]				10.4	11.8	
峰3 直径 [nm]	N/A	N/A	N/A	N/A	4260	N/A
密度 [%]					1.2	

[0943] 20.3 讨论

[0944] 实验证实,可以基本上在水中在更高的浓度 (在 130mg/mL 没有观察到溶解度极限) 配制 2.5(E)mg/l (在蛋氨酸、组氨酸中缓冲)。使用水 3 体积交换后,渗透物和渗余物的重量摩尔渗透压浓度低于 10mOsmol/kg, 这表明已经有效地减少缓冲液赋形剂。使用水进行 DF/UF 过程中,减少了 2.5(E)mg/l 溶液的乳色 (最佳外观),这也被 DS 起始溶液 14.5、3- 倍体积交换后 6.55、4- 倍体积交换后 10.5 的浊度值 (比浊测量法浊度单位 (NTU)) 减小所反映。

[0945] 用其它抗体可以看到,由于赋形剂减少,通过DLS测得的流体动力学直径减小(分子间电荷-电荷斥力加上随机的布朗运动,导致更高的分子迁移,翻译成更低的计算 $D_h$ 值)。在DF/UF操作之前(pH 5.94)和之后(pH 5.99),2.5(E)mg/l溶液的pH基本上相同。

[0946] 通过DLS监视证实,在DF/UF操作过程中,2.5(E)mg/l保持稳定。没有检测到高分子量试样的大量增加。

[0947] 实施例 21:在水中配制的阿达木单抗的制备和其稳定性研究

[0948] 下述实施例描述了源自上述实施例所述方法(即阿达木单抗成功地渗析进水中)的包含阿达木单抗的制剂的稳定性。

[0949] 材料和方法

[0950] 使用纯水,渗滤 3323.6g 阿达木单抗溶液(71.3mg/mL)。用纯水进行 7- 倍体积交换后(理论的赋形剂减少,99.9%),将蛋白溶液分别稀释/超滤至最终目标浓度 220 和 63mg/mL。进行PH、重量摩尔渗透压浓度、粘度、电导率、PCS、目检和蛋白浓度测量(OD280),以监视DF/UF处理后蛋白的状态。

[0951] DF/UF处理后,将蛋白溶液无菌过滤(0.22 $\mu$ m Millipak-60和Millipak-200膜过滤器),随后装入BD HyPak SCF™ 1mL长注射器,后者配有27.5G RNS针头和BD HyPak BSCF 4432/50无菌塞。填充体积是每个注射器约0.825mL。

[0952] 填充后,分别在2-8℃、25℃和40℃保存注射器,并根据下述取样计划的指示进行分析。

[0953] ●阿达木单抗药品(阿达木单抗消光系数280nm:1.39mL/mg·cm):药品不含有聚山梨醇酯80。DS缓冲液,pH 5.38。

[0954] ●Sartorius Sartocoon Slice渗滤系统,配有Ultrasert PES膜盒(50kDa和30kDa截止)。根据Sartorius操作说明书,在环境温度以连续模式操作Sartocoon Slice系统。

[0955] ●pH电极

[0956] ●PerkinElmer紫外可见分光光度计,Lambda 35,用于蛋白浓度测量(280nm波长)。一次性紫外比色皿,1.5mL,半微量,聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA),用于浓度测量。

[0957] ●灭菌的注射用水 Ph. Eur./USP 用作DF/UF介质。

[0958] ●Vogel渗透压计OM815,用于重量摩尔渗透压浓度测量(用400mOsmol/kg NaCl校准溶液校正,产品号Y1241,Herbert Knauer GmbH,Berlin,德国)。

[0959] ●根据Anton Paar操作说明书,使用Anton Paar微粘度计,类型AWVn,对蛋白溶液进行粘度评估。在20℃评估粘度。

[0960] ●InoLab Cond Level 2WTW装置用于电导率测量,标准化至25℃。

[0961] ●Malvern Instruments Zetasizer nano ZS,用于测定Z-平均值,应用标准方法。使用通过落球粘度计(Anton Paar微粘度计,类型AWVn,在25℃)得到的粘度数据,在25℃进行测量。

[0962] HPLC方法

[0963] ●阿达木单抗,SEC分析:Sephadex 200柱(Pharmacia目录号175175-01)。流动相20mM磷酸钠,150mM氯化钠,pH 7.5,0.5mL/min流速,环境温度,检测紫外线214nm和280nm。每个样品用Milli-Q水稀释至1.0mg/mL,样品注射负载50 $\mu$ g(一式两份注射)。

[0964] ●阿达木单抗, IEC 分析 :Dionex, Propac WCX-10 柱 (p/n 054993) 以及对应的保护柱 (p/n 054994)。分离条件 :流动相 A :10mM 磷酸钠, pH 7.5 ;流动相 B 10mM 磷酸钠, 500mM 氯化钠, pH 5.5。1.0mL/min 流速, 环境温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL, 样品注射负载 100  $\mu$ g, 一式两份注射。

[0965] 蛋白浓度的计算

[0966] 计算公式 :

$$[0967] \quad E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$

[0968]  $\epsilon$  ——吸收系数

[0969]  $c$  ——浓度

[0970]  $d$  ——光必须穿过的比色皿长度

[0971]  $E$  ——吸光度

[0972]  $I_0$  ——起始光强度

[0973]  $I$  ——穿过样品后的光强度

[0974]

$$\epsilon_{\text{阿达木单抗}} = 1.39 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

[0975] 取样计划

[0976] 在下面列出的温度保存制备的溶液的样品, 并在研究开始后指定的时间点取样 (x)。

[0977]

温度	T0	1m	3m
5°C	-	x	x
25°C	x	x	x
40°C	-	x	x

[0978]

测试参数	测试方法
肉眼可见的颗粒	类似 DAC (EA 4.43)
在显微镜下才能看得见的颗粒	类似 Ph.Eur./USP EA 4.44
浊度	类似 Ph.Eur. (EA 4.42)
颜色 (目检)	Ph.Eur. (EA 4.50)
pH	Ph.Eur. (EA 4.24)
尺寸排阻HPLC	上文所述
阳离子交换HPLC	上文所述

[0979] 阿达木单抗的 DF/UF 处理

[0980] 表 51 描述了渗滤后的阿达木单抗特征。

[0981] 表 51

[0982]

样品	蛋白浓度 [mg/mL]	pH	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	粘度 [cP]	目检	电导率 [ $\mu$ S/cm]	PCS [Z-平均值/ d. nm]
高浓度	220	5.57	26	27.9	轻微乳色, 基本上没有 肉眼可见 颗粒	1167	0.34
低浓度	63	5.44	5	1.8	轻微乳色, 基本上没有 肉眼可见 颗粒	522	1.85

[0983] 在附录 D 中,描述了在不同温度保存后的阿达木单抗特征,包括澄清度和乳色,液体显色程度,SEC。

[0984] 结论

[0985] 上面的实施例提供了单克隆抗体阿达木单抗的渗滤 / 超滤 (DF/UF) 实验,其中使用水 (灭菌的注射用水 Ph. Eur. /USP) 作为渗滤介质。

[0986] 如下对阿达木单抗进行 DF/UF 处理:使用纯水作为 DF/UF 交换介质,在 pH 5.57、在高浓度 (220mg/mL) 和在 pH 5.44、在低浓度 (63mg/mL) 配制,没有诱发溶液朦胧、严重的乳色或浑浊形成。

[0987] 在 2-8°C、25°C 和 40°C 在 SCF 注射器中保存来自 DF/UF 实验的阿达木单抗 3 个月。得到的数据指向有利的蛋白总稳定性。

[0988] 总之,使用纯水作为 DF/UF 交换介质来处理和配制蛋白是可行的。假定理想的 100% 赋形剂膜渗透性,可以估计出约 99.9% 最大赋形剂减少。

[0989] 实施例 22:使用非离子型赋形剂在水中配制的阿达木单抗的稳定性研究

[0990] 下述实施例描述了含有在水中的抗体（即阿达木单抗）和额外的非离子型赋形剂的制剂的稳定性研究。

[0991] 材料和方法

[0992] 阿达木单抗材料与实施例 21 相同 (DF/UF 处理)。DF/UF 处理后, 如表 52 所示配制蛋白溶液。选择甘露醇作为糖醇组（如甘露醇, 山梨醇, 等）的实例。选择蔗糖作为糖组（如蔗糖, 海藻糖, 棉子糖, 麦芽糖, 等）的实例。选择聚山梨醇酯 80 作为非离子型表面活性剂组（如聚山梨醇酯 80, 聚山梨醇酯 20, pluronic F68, 等）的实例。制备 ~ 10.7mL 每种制剂。对制备后的每种制剂进行重量摩尔渗透压浓度、粘度和 PCS 测量。

[0993] 表 52

[0994]

最终蛋白浓度	甘露醇 (mg/mL)	蔗糖 (mg/mL)	聚山梨醇酯80 (% w/w)	样品名称
50 mg/mL	50	---	---	LI50/01
50 mg/mL	---	80	---	LI50/02
50 mg/mL	50	---	0.01	LI50/03
50 mg/mL	---	80	0.01	LI50/04
50 mg/mL	50	---	0.1	LI50/05
50 mg/mL	---	80	0.1	LI50/06
50 mg/mL	---	---	0.01	LI50/07
50 mg/mL	---	---	0.1	LI50/08

[0995]

200 mg/mL	50	---	---	LI200/01
200 mg/mL	---	80	---	LI200/02
200 mg/mL	50	---	0.01	LI200/03
200 mg/mL	---	80	0.01	LI200/04
200 mg/mL	50	---	0.1	LI200/05
200 mg/mL	---	80	0.1	LI200/06
200 mg/mL	---	---	0.01	LI200/07
200 mg/mL	---	---	0.1	LI200/08

[0996] ● 在无菌注射用水中的聚山梨醇酯 80 原液 0.5% 和 5% : 以 1 : 50 比例加入 (210  $\mu$ L 加入 10.5mL 阿达木单抗溶液, 210  $\mu$ L 注射用水加入没有用表面活性剂配制的样品, 以确保所有样品中相同的蛋白浓度)

[0997] ● 以固体形式加入甘露醇 / 蔗糖 (分别 525mg/840mg)。

[0998] 将制品无菌过滤 (Millex GV, Millipore, 0.22  $\mu$ m,  $\varnothing$ 33 mm, Art. SLGV033RS), 随后装入 BD HyPak SCF™ 1mL 长注射器, 后者配有 27.5G RNS 针头和 BD HyPak BSCF 4432/50 无菌塞。填充体积是每个注射器约 0.6mL。

[0999] 填充后, 分别在 2-8°C、25°C 和 40°C 保存注射器, 并根据下述取样计划的指示进行

分析。

[1000] ●阿达木单抗药品（阿达木单抗消光系数 280nm :1.39mL/mgcm）：药品不含有聚山梨醇酯 80。DS 缓冲液，pH 5.38。

[1001] ● PH 电极

[1002] ●灭菌的注射用水 Ph. Eur. /USP 用作 DF/UF 介质。

[1003] ●甘露醇，聚山梨醇酯 80，和蔗糖，都符合 Ph. Eur. 质量

[1004] ● Vogel 渗透压计 OM815，用于重量摩尔渗透压浓度测量（用 400mOsmol/kg NaCl 校准溶液校正，产品号 Y1241，Herbert Knauer GmbH，Berlin，德国）。

[1005] ●根据 Anton Paar 操作说明书，使用 Anton Paar 微粘度计，类型 AWVn，对蛋白溶液进行粘度评估。在 20℃ 评估粘度。

[1006] ● Fluostar Optima, BMG Labtech（在孔板中在 344nm 吸光度测量，浊度评价）

[1007] ● Malvern Instruments Zetasizer nano ZS，用于测定 Z- 平均值，应用标准方法。使用通过落球粘度计（Anton Paar 微粘度计，类型 AWVn，在 25℃）得到的粘度数据，在 25℃ 进行测量。

[1008] HPLC 方法

[1009] ●阿达木单抗，SEC 分析：Sephadex 200 柱（Pharmacia 目录号 175175-01）。流动相 20mM 磷酸钠，150mM 氯化钠，pH 7.5，0.5mL/min 流速，环境温度，检测紫外线 214nm 和 280nm。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL，样品注射负载 50 μg（一式两份注射）。

[1010] ●阿达木单抗，IEC 分析：Dionex，Propac WCX-10 柱以及对应的保护柱。分离条件：流动相 A：10mM 磷酸钠，pH 7.5；流动相 B 10mM 磷酸钠，500mM 氯化钠，pH 5.5。1.0mL/min 流速，环境温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL，样品注射负载 100 μg，一式两份注射。

[1011] 取样计划

[1012] 在 5℃、25℃ 和 40℃ 保存制备的溶液的样品，并在研究开始后 1 分钟（5℃ 和 40℃）或在 T0 和 1 分钟（25℃）取样。根据适当的方法，测量实验参数，例如，肉眼观察颜色，在 344nm 吸光度测定浊度。

[1013] 起始制剂表征

[1014] 表 53 描述了起始制剂重量摩尔渗透压浓度和粘度。

[1015] 表 53

[1016]

批次	组成	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol]	粘度 [mPas]
LI 50 / 01	50mg/mL 甘露醇	309	1,9796
LI 50 / 02	80mg/mL 蔗糖	272	2,1284
LI 50 / 03	50mg/mL 甘露醇; 0.01% Tween 80	307	1,9843
LI 50 / 04	80mg/mL 蔗糖; 0.01% Tween 80	269	2,1194
LI 50 / 05	50mg/mL 甘露醇; 0.1% Tween 80	307	1,9980
LI 50 / 06	80mg/mL 蔗糖; 0.1% Tween 80	272	2,1235
LI 50 / 07	0.01% Tween 80	8	1,7335
LI 50 / 08	0.1% Tween 80	8	1,8162
LI 200 / 01	50mg/mL 甘露醇	396	21,395
LI 200 / 02	80mg/mL 蔗糖	351	21,744
LI 200 / 03	50mg/mL 甘露醇; 0.01% Tween 80	387	21,233
LI 200 / 04	80mg/mL 蔗糖; 0.01% Tween 80	350	21,701
LI 200 / 05	50mg/mL 甘露醇; 0.1% Tween 80	387	21,592
LI 200 / 06	80mg/mL 蔗糖; 0.1% Tween 80	355	21,943
LI 200 / 07	0.01% Tween 80	27	21,296
LI 200 / 08	0.1% Tween 80	28	21,889

[1017] 一个浓度的所有制剂表现出相同的粘度。含有蔗糖的制剂的粘度略高。可以如下解释这些高度浓缩的制剂与在水中的高度浓缩的制剂（实施例 A，粘度 27.9cP）相比降低的粘度：在实施例 21 中，用聚山梨醇酯 80 储液或淡水（plain water）稀释样品，产生～215mg/mL 和 220mg/mL 的终浓度。

[1018] 表 54 描述了为每种样品测得的 PCS 数据。

[1019] 表 54

[1020]

样品	PCS
	[Z-平均值/d. nm]
LI50/01	2.58
LI50/02	2.22
LI50/03	2.13
LI50/04	2.22
LI50/05	2.25
LI50/06	2.55
LI50/07	2.87
LI50/08	1.94

[1021]

LI200/01	0.50
LI200/02	0.43
LI200/03	0.36
LI200/04	0.38
LI200/05	0.37
LI200/06	0.41
LI200/07	0.35
LI200/08	0.36

[1022] 在表 54 中提供的数据表明, z- 平均值没有明显不同于从不含非离子型赋形剂的系统中的阿达木单抗溶液得到的值 (63mg/mL, 1.85d. nm, 220mg/mL, 0.34d. nm, 实施例 21)。

[1023] 保存后的阿达木单抗表征

[1024] 附录 E 提供了保存后阿达木单抗稳定性数据。

[1025] 安慰剂溶液的电导率

[1026] 表 55 描述了非离子型赋形剂对不同阿达木单抗制剂的电导率的影响。使用灭菌的注射用水 Ph. Eur. /USP, 制备所有安慰剂溶液。

[1027] 表 55

[1028]

甘露醇 (mg/mL)	蔗糖 (mg/mL)	聚山梨醇酯80 (% w/w)	电导率 ( $\mu\text{S/cm}$ )
---	---	---	1.1
50	---	---	1.2
---	80	---	2.2
50	---	0.01	2.3
---	80	0.01	1.4
50	---	0.1	2.6
---	80	0.1	3.6
---	---	0.01	1.2
---	---	0.1	2.6

[1029] 结论

[1030] 在 2-8°C、25°C 和 40°C 在 SCF 注射器中保存制品 1 个月。从保存研究得到的数据表明, 测试的所有试剂中的蛋白都有总稳定性。稳定性数据与来自实施例 21 的样品的稳定性相当。含有安慰剂溶液的非离子型赋形剂的电导率测量证实了有些赋形剂的电导率在某些  $\mu\text{S/cm}$  范围内的轻微增加。PCS 测量证实, 与不含非离子型赋形剂的系统相比, 流体动力学直径没有显著增加。

[1031] 总之, 使用纯水作为 DF/UF 交换介质来处理蛋白和用非离子型赋形剂制剂是可行的。也在具有下述组成的缓冲液中, 通过 PCS 评估阿达木单抗: 10mM 磷酸盐缓冲液, 100mM 氯化钠, 10mM 柠檬酸盐缓冲液, 12mg/mL 甘露醇, 0.1% 聚山梨醇酯 80, pH 5.2。阿达木单抗浓度分别是 50mg/mL 和 200mg/mL。50mg/mL 制剂的 z- 平均值是 11.9d. nm, 200mg/mL 制剂的 z- 平均值是 1.01d. nm。因而, 清楚地证实, 在给定蛋白浓度的流体动力学直径依赖于离

子强度（显然，在含有盐的缓冲液中，直径更高）。

[1032] 实施例 23：使用非离子型赋形剂在水中配制的 J695 的制备

[1033] 下述实施例描述了含有在水中的抗体（即阿达木单抗）和额外的非离子型赋形剂的制剂的制备。该实施例也描述了使用额外的非离子型赋形剂在水中配制的 J695 的稳定性（通过例如 SE-HPLC 和 IEC 测量）。

[1034] 材料和方法

[1035] 应用 Slide-A-Lyzer 渗析盒，使用纯水渗析在不同 pH 的 2x30mL J695 溶液（~125mg/mL）。分别相对 3L 纯水，渗析样品 3 次（理论的赋形剂减少，1 : 1,000,000）。使用 Vivaspin 20 浓缩器，将蛋白溶液超滤至最终目标浓度 200mg/mL。进行 PH、重量摩尔渗透压浓度、粘度、电导率、PCS、目检、HPLC 和蛋白浓度测量 (OD280)，以监视处理过程中和之后蛋白的状态。

[1036] 处理后，如下所示配制蛋白溶液。选择甘露醇作为糖醇组（如甘露醇，山梨醇，等）的实例。选择蔗糖作为糖组（如蔗糖，海藻糖，棉子糖，麦芽糖，等）的实例。选择聚山梨醇酯 80 作为非离子型表面活性剂组（如聚山梨醇酯 80，聚山梨醇酯 20，pluronic F68，等）的实例。制备 0.5mL 体积的每种制剂。进行 PH、重量摩尔渗透压浓度、目检和 HPLC 分析，以监视样品制备后蛋白的状态。

[1037] 表 56：不同 J695 制剂的描述

[1038]

最终蛋白浓度	甘露醇 (mg/mL)	蔗糖 (mg/mL)	聚山梨醇酯80 (% w/w)	样品名称*
200 mg/mL	50	---	---	LI200/01/5
200 mg/mL	---	80	---	LI200/02/5
200 mg/mL	50	---	0.01	LI200/03/5
200 mg/mL	---	80	0.01	LI200/04/5
200 mg/mL	50	---	0.1	LI200/05/5
200 mg/mL	---	80	0.1	LI200/06/5
200 mg/mL	---	---	0.01	LI200/07/5
200 mg/mL	---	---	0.1	LI200/08/5
200 mg/mL	50	---	---	LI200/01/6
200 mg/mL	---	80	---	LI200/02/6
200 mg/mL	50	---	0.01	LI200/03/6
200 mg/mL	---	80	0.01	LI200/04/6
200 mg/mL	50	---	0.1	LI200/05/6
200 mg/mL	---	80	0.1	LI200/06/6
200 mg/mL	---	---	0.01	LI200/07/6
200 mg/mL	---	---	0.1	LI200/08/6

[1039] \* 术语“/5”或“/6”加到任意样品名称中，以区分 pH 5 和 6 的样品。

[1040] ● 在无菌注射用水中的聚山梨醇酯 80 原液 0.5% 和 5%：以 1 : 50 比例加入（10  $\mu$ L 加入 0.5mL J695 溶液，10  $\mu$ L 注射用水加入没有用表面活性剂配制的样品，以确保所有样品中相同的蛋白浓度）

[1041] ● 以固体形式加入甘露醇 / 蔗糖（分别 25mg/40mg）。

- [1042] ● J695 药品 (J695 消光系数 280nm :1.42mL/mg cm) :药品不含有聚山梨醇酯 80。DS 缓冲液, pH 6.29。
- [1043] ● pH 电极
- [1044] ● 去矿物质的且无菌过滤的水用作渗析介质。
- [1045] ● 甘露醇, 聚山梨醇酯 80, 和蔗糖, 都符合 Ph. Eur. 质量
- [1046] ● Vogel 渗透压计 OM815, 用于重量摩尔渗透压浓度测量 (用 400mOsmol/kg NaCl 校准溶液校正, 产品号 Y1241, Herbert Knauer GmbH, Berlin, 德国)。
- [1047] ● 根据 Anton Paar 操作说明书, 使用 Anton Paar 微粘度计, 类型 AWVn, 对蛋白溶液进行粘度评估。在 20℃ 评估粘度。
- [1048] ● Fluostar Optima, BMG Labtech (在孔板中在 344nm 吸光度测量, 浊度评价)
- [1049] ● Eppendorf 离心机 5810R
- [1050] ● Slide-A-Lyzer 渗析盒, Pierce Biotechnology (目录号 66830)
- [1051] ● Vivaspin 20 浓缩器, 10kDa PES 膜 (Vivascience, 产品号 VS2001), 根据标准的操作说明书使用。
- [1052] ● PerkinElmer 紫外可见分光光度计, Lambda 35, 用于蛋白浓度测量 (280nm 波长)。一次性紫外比色皿, 1.5mL, 半微量, 聚 (甲基丙烯酸甲酯) (PMMA), 用于浓度测量。
- [1053] ● InoLab Cond Level2WTW 装置用于电导率测量, 标准化至 25℃。
- [1054] ● Malvern Instruments Zetasizer nano ZS, 用于测定 Z- 平均值, 应用标准方法。使用通过落球粘度计 (Anton Paar 微粘度计, 类型 AWVn, 在 25℃) 得到的粘度数据, 在 25℃ 进行测量。
- [1055] HPLC 方法
- [1056] ● J695, SEC 分析 :Tosoh Bioscience G3000swxl, 7.8mmx30cm, 5 μm (目录号 08541)。流动相 211mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/92mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0。0.25mL/min 流速, 环境温度, 检测紫外线 214nm 和 280nm。用 Milli-Q 水将每个样品稀释至 2.0mg/mL, 样品注射负载 20 μg (一式两份注射)。
- [1057] ● J695, IEC 分析 :Dionex, Propac WCX-10 柱 (p/n 054993) 以及对应的保护柱 (p/n 054994)。分离条件 :流动相 A :10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.0 ;流动相 B 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500mM NaCl, pH 6.0。1.0mL/min 流速, 35℃ 温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL, 样品注射负载 100 μg。
- [1058] 蛋白浓度的计算
- [1059] 计算公式 :
- [1060] 
$$E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\epsilon \times d}$$
- [1061] ε —— 吸收系数
- [1062] c —— 浓度
- [1063] d —— 光必须穿过的比色皿长度
- [1064] E —— 吸光度
- [1065] I<sub>0</sub> —— 起始光强度
- [1066] I —— 穿过样品后的光强度

[1067]

$$\epsilon_{\text{阿达木单抗}} = 1.42 \frac{\text{mL}}{\text{mg} \times \text{cm}}$$

[1068] J695 的处理

[1069] 在加入任何非离子型赋形剂之前,表征在水中的 J695。表 57 提供了渗析 / 超滤过程中 J695 表征的细节。

[1070] 表 57

[1071]

样品	蛋白浓度 [mg/mL]	pH	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	粘度 [cP]	目检	电导率 [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]	PCS [Z-平均值/ d. nm]
原料	~ 125 mg/mL	6.29 (对于低PH 样品, 用 0.01M盐酸 调节至 4.77)	N/A	N/A	轻微乳色, 基本 没有肉眼可见 颗粒	N/A	N/A
渗析后, 低pH	42.5 mg/mL	5.21	7	1.60	轻微乳色, 基本没有肉眼 可见颗粒	602	1.5
渗析后, 高pH	56.9 mg/mL	6.30	6	2.11	轻微乳色, 基本没有肉眼 可见颗粒	500	2.7
浓缩后, 低pH	206 mg/mL	5.40	50	39.35	轻微乳色, 基本没有肉眼 可见颗粒	1676	0.21
浓缩后, 高pH	182 mg/mL	6.46	39	47.76	轻微乳色, 基本没有肉眼 可见颗粒	1088	0.21

[1072] 含有非离子型赋形剂的制剂的表征

[1073] 将不同的非离子型赋形剂加入 J695 制剂后 (参见表 56 中的描述), 分析每种制剂。在下面的表 58 中描述了重量摩尔渗透压浓度、目检和 pH 的结果。

[1074] 表 58

[1075]

样品	pH	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	目检
LI200/01/5	5.39	473	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/02/5	5.38	402	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/03/5	5.37	466	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/04/5	5.37	397	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/05/5	5.37	458	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/06/5	5.37	396	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/07/5	5.36	50	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/08/5	5.36	48	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/01/6	6.43	428	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/02/6	6.42	405	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/03/6	6.43	348	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/04/6	6.43	383	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/05/6	6.42	432	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/06/6	6.42	402	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/07/6	6.43	38	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒
LI200/08/6	6.43	39	轻微乳色, 基本没有肉眼可见颗粒

[1076] HPLC 数据

[1077] 还使用 SE-HPLC 和 IEX, 检查了每种含有非离子型赋形剂的 J695 制剂。在表 59 和 60 中提供了这些分析的数据, 并提供了处理和配制过程中 J695 稳定性的概况。

[1078] 表 59: 不同 J695 制剂的 SE-HPLC 结果

[1079]

	聚集体总和	单体	片段总和
样品名称	[%]	[%]	[%]
pH 5	0,608	98,619	0,773
125mg/mL	0,619	98,598	0,783
起始	0,614	98,608	0,778
pH 6	0,427	98,809	0,764
125mg/mL	0,392	99,005	0,603
起始	0,409	98,807	0,683
pH 5	0,654	98,604	0,742
42.5mg/mL	0,677	98,560	0,763
透析后	0,558	98,552	0,753
pH 6	0,748	98,541	0,711
58.9mg/mL	0,739	98,597	0,665
透析后	0,733	98,589	0,688
pH 5	0,913	98,416	0,671
208 mg/mL	0,923	98,356	0,721
在水中	0,918	98,388	0,698
pH 5	0,928	98,312	0,760
50 mg/mL 甘露醇	0,926	98,339	0,736
LI 200 / 01 / s	0,927	98,325	0,748
pH 5	0,925	98,319	0,755
80mg/mL 蔗糖	0,929	98,332	0,738
LI 200 / 02 / s	0,927	98,326	0,747
pH 5, 50mg 甘露醇	0,942	98,326	0,732
0.01% Tween 80	0,942	98,300	0,758
LI 200 / 03 / s	0,942	98,313	0,748
pH 5, 80mg 蔗糖	0,944	98,315	0,741
0.01% Tween 80	0,944	98,339	0,717
LI 200 / 04 / s	0,944	98,327	0,729
pH 5, 50mg 甘露醇	0,941	98,348	0,711
0.1% Tween 80	0,967	98,299	0,734
LI 200 / 05 / s	0,954	98,329	0,722
pH 5, 50mg 甘露醇	0,944	98,346	0,710
0.1% Tween 80	0,948	98,340	0,712
LI 200 / 06 / s	0,948	98,343	0,711
pH 5, 50mg 甘露醇	0,946	98,348	0,706
0.1% Tween 80	0,953	98,328	0,719
LI 200 / 07 / s	0,949	98,338	0,713
pH 5, 50mg 甘露醇	0,987	98,313	0,701
0.1% Tween 80	0,994	98,283	0,723
LI 200 / 08 / s	0,991	98,298	0,712
pH 6	1,091	98,169	0,739
182 mg/mL	1,075	98,221	0,703
在水中	1,083	98,195	0,721
pH 6	0,998	98,350	0,652
50 mg/mL 甘露醇	1,002	98,364	0,634
LI 200 / 01 / s	1,000	98,357	0,643
pH 6	1,028	98,243	0,729
80mg/mL 蔗糖	0,983	98,355	0,662
LI 200 / 02 / s	1,005	98,289	0,695
pH 6, 50mg 甘露醇	1,005	98,322	0,673
0.01% Tween 80	1,008	98,317	0,676
LI 200 / 03 / s	1,008	98,319	0,674
pH 6, 80mg 蔗糖	0,987	98,363	0,649
0.01% Tween 80	0,987	98,321	0,692
LI 200 / 04 / s	0,987	98,342	0,671
pH 6, 50mg 甘露醇	0,996	98,326	0,678
0.1% Tween 80	0,996	98,338	0,666
LI 200 / 05 / s	0,998	98,332	0,672
pH 6, 80mg 蔗糖	0,998	98,305	0,697
0.1% Tween 80	0,984	98,345	0,671
LI 200 / 06 / s	0,991	98,325	0,684
pH 6	1,000	98,325	0,675
0.01% Tween 80	0,994	98,347	0,659
LI 200 / 07 / s	0,997	98,338	0,667
pH 6	1,003	98,314	0,682
0.01% Tween 80	0,998	98,338	0,664
LI 200 / 08 / s	1,001	98,328	0,673

[1080] 表 60 :不同 J695 制剂的 IEX 结果

[1081]

样品名称	酸性峰总和	谷氨酰胺总和	碱性峰总和
	[%]	[%]	[%]
pH 5	4,598		3,303
125mg/mL	4,599		3,177
起始 mat.	4,599	02,162	3,240
pH 6	4,597		3,159
125mg/mL	4,629		3,156
起始 mat.	4,613	02,229	3,156
pH 5	4,706		3,177
42.5mg/mL	4,725		3,205
渗析后	4,715	02,094	3,191
pH 6	4,739		3,182
56.9mg/mL	4,752		3,167
渗析后	4,746	02,060	3,174
pH 5	4,655		3,167
206 mg/mL	4,676		3,210
在水中	4,666	02,146	3,189
pH 5	4,721		3,321
50 mg/mL 甘露醇	4,733		3,356
LI 200 / 01 / 5	4,727	01,838	3,338
pH 5	4,715		3,299
80mg/mL 蔗糖	4,667		3,338
LI 200 / 02 / 5	4,701	01,081	3,318
pH 5, 50mg 甘露醇	4,767		3,246
0.01% Tween 80	4,736		3,253
LI 200 / 03 / 5	4,762	01,869	3,269
pH 5, 80mg 蔗糖	4,751		3,257
0.01% Tween 80	4,742		3,229
LI 200 / 04 / 5	4,746	02,011	3,243
pH 5, 50mg 甘露醇	4,780		3,420
0.1% Tween 80	4,720		3,394
LI 200 / 05 / 5	4,750	01,043	3,407
pH 5, 80mg 蔗糖	4,756		3,421
0.1% Tween 80	4,894		3,375
LI 200 / 06 / 5	4,625	01,777	3,388
pH 5	4,813		3,425
0.01% Tween 80	4,757		3,413
LI 200 / 07 / 5	4,786	01,786	3,419
pH 5	4,769		3,361
0.1% Tween 80	4,842		3,335
LI 200 / 08 / 5	4,806	01,046	3,346
pH 6	4,882		3,452
182 mg/mL	4,886		3,451
在水中	4,894	01,664	3,451
pH 6	4,843		3,456
50 mg/mL 甘露醇	4,833		3,393
LI 200 / 01 / 6	4,838	01,737	3,425
pH 6	4,923		3,407
80mg/mL 蔗糖	4,896		3,491
LI 200 / 02 / 6	4,909	01,042	3,489
pH 6, 50mg 甘露醇	4,864		3,423
0.01% Tween 80	4,899		3,392
LI 200 / 03 / 6	4,895	01,711	3,409
pH 6, 80mg 蔗糖	4,870		3,320
0.01% Tween 80	4,928		3,369
LI 200 / 04 / 6	4,899	01,756	3,395
pH 6, 50mg 甘露醇	4,905		3,385
0.1% Tween 80	4,922		3,489
LI 200 / 05 / 6	4,914	01,049	3,497
pH 6, 80mg 蔗糖	4,973		3,443
0.1% Tween 80	4,962		3,335
LI 200 / 06 / 6	4,956	01,044	3,369
pH 6	4,934		3,413
0.01% Tween 80	4,899		3,392
LI 200 / 07 / 6	4,916	01,681	3,402
pH 6	4,884		3,410
0.1% Tween 80	4,934		3,366
LI 200 / 08 / 6	4,909	01,709	3,388

[1082] 结论

[1083] 上面的实施例提供了一个实验,其中用水(去矿物质的且无菌过滤的水)作为单

克隆抗体 J695 的渗析介质。

[1084] 使用纯水作为交换介质,对 J695 进行渗析和浓缩处理,在高浓度(分别 206 和 182mg/mL)、在 pH 5.40 和 6.46 配制,没有诱发溶液胶凝、严重乳色或浑浊形成。

[1085] 表征来自处理实验的 J695,并用不同的非离子型赋形剂配制。得到的数据指向测试的制剂中有利的蛋白总稳定性。

[1086] 总之,使用纯水作为交换介质来处理蛋白和用非离子型赋形剂制剂是可行的。假定理想的 100% 赋形剂膜渗透性,可以估计出约 99.9% 最大赋形剂减少。

[1087] 实施例 24 :在水中配制的阿达木单抗的可注射性

[1088] 对来自实施例 21 的制剂(63 和 220mg/mL 阿达木单抗)进行注射器排出的力测量。将 220mg/mL 样品的阿达木单抗分别稀释至 200mg/mL、150mg/mL 和 100mg/mL,也进行评估。在 80mm/min 的恒定给料,使用 Zwick Z2.5/TN1S。最后,使用 Anton Paar 微粘度计,类型 AWVn,在 20°C,评估制剂的粘度数据。下述的数据收集表明,针头和注射器直径都对注射器排出的滑动力具有显著影响。令人惊奇地,通过应用与 63mg/mL(在 20°C 粘度 1.8cP)的更低浓缩的制剂等价的排出力,可以递送 220mg/mL(在 20°C 粘度 27.9cP)的高度浓缩的溶液。

[1089] 表 61 :在不同包装系统中得到的阿达木单抗溶液的滑动力值。

[1090]

阿达木 单抗浓度 (粘度)	BD HyPak SCF™ 1 mL 长注射器, 配备有 27.5G RNS 针头 BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	D HyPak SCF™ 1 mL 长注射器, 配备有			1 mL Soft-Ject® Tuberkulin 注射器 (比BD HyPak注射器更小 的直径), 配备有 27G x 1/2" 针头 (Sterican)
		25G x 5/8" 针头 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	26G x 1/2" 针头 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	27G x 1/2" 针头 (Sterican) BD HyPak BSCF 4432/50 塞子	
63 mg/mL (1.8 cP)	3.9 N	-	-	-	-
100 mg/mL (2.9 cP)	3.30 N	1.02 N	1.33 N	1.69 N	1.00 N
150 mg/mL (7.4 cP)	4.63 N	1.16 N	1.58 N	2.93 N	1.33 N
200 mg/mL (15.7 cP)	7.25 N	2.16 N	3.24 N	6.25 N	2.55 N
220 mg/mL (27.9 cP)	14.5 N	2.99 N	3.97 N	9.96 N	3.16 N

[1091] 上表暗示,即使对于高浓度的蛋白,这样的制剂有助于使用注射器给药,例如,皮下给药。

[1092] 实施例 25-28

[1093] 实施例 25-28 描述了含有在水中配制的抗体的不同抗体制剂(在实施例 26-28 中称作低离子强度蛋白制剂)的冷冻/融化稳定性实验。通过在冷冻状态和液体状态之间循环不同的蛋白制剂最高达 4 次,评价了许多抗体的冷冻融化行为。借助于温度受控的 -80°C 冷冻机进行冷冻,借助于 25°C 温度受控的水浴进行融化。将各约 25mL 抗体溶液装入用于这些实验系列的 30mL PETG 容器。

[1094] 在显微镜下才能看得见的颗粒的形成代表着药用蛋白制剂的重要安全性关心。

认为在显微镜下才能看得见的蛋白颗粒具有不利地影响临床性能的潜力,其程度类似于或大于其它降解产物,例如可溶的聚集体和化学修饰的物质,它们作为产物表征和质量保证程序的一部分而予以评价和定量 (Carpenter, JF 等人 Commentary :Overlooking subvisible particles in therapeutic protein products :baps that may compromise product quality. J. Pharm. Sci, 2008)。如在下列实施例中所证实的,当在本发明的制剂中配制时,许多抗体令人惊奇地稳定的,特别是在在显微镜下才能看得见的颗粒形成方面。

[1095] 实施例 25 :在水中用非离子型赋形剂配制的阿达木单抗的冷冻 / 融化稳定性

[1096] 下述实施例描述了抗体 (例如,阿达木单抗) 在水制剂中和在已经加入非离子型赋形剂的水制剂中的稳定性。对来自实施例 21 和 22 的样品的等分试样进行冷冻 / 融化实验,并通过 SE-HPLC 进行分析。将数据与来自使用在下述组成的缓冲液中的阿达木单抗的冷冻 / 融化实验的 SE-HPLC 结果相对比 :10mM 磷酸盐缓冲液,100mM 氯化钠,10mM 柠檬酸盐缓冲液,12mg/mL 甘露醇,0.1% 聚山梨醇酯 80, pH 5.2。分别在 50mg/mL 和 200mg/mL 使用在该后者缓冲液中的阿达木单抗。如下在 Eppendorf 帽中进行冷冻 / 融化循环 :冷冻至  $-80^{\circ}\text{C}$ ,在冷冻机中保存 8 小时,然后在室温融化 1 小时,随后取样。每个制剂进行 5 个循环,即,下表中所述的循环 0、1、2、3、4 和 5。

[1097] HPLC 方法

[1098] 阿达木单抗, SEC 分析 :Sephadex 200 柱 (Pharmacia 目录号 175175-01)。流动相 20mM 磷酸钠,150mM 氯化钠, pH 7.5, 0.5mL/min 流速,环境温度,检测紫外线 214nm 和 280nm。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL,样品注射负载 50  $\mu\text{g}$  (一式两份注射)。

[1099] 冷冻 / 融化循环后的阿达木单抗表征

[1100] 表 62 描述了冷冻 / 融化实验过程中的阿达木单抗纯度。关于样品组成,参见实施例 21 和 22。

[1101] 表 62 :

[1102]

## 冷冻/融化-低离子型阿达木单抗

循环	单体分数 [%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	99.605	99.629	99.632	99.626	99.619	99.626	99.653	99.655
1	99.743	99.768	99.739	99.759	99.731	99.725	99.686	99.669
2	99.715	99.726	99.571	99.661	99.721	99.721	99.601	99.619
4	99.668	99.689	99.632	99.678	99.523	99.724	99.491	99.542
5	99.627	99.771	99.539	99.772	99.525	99.773	99.357	99.445

循环	聚集体分数 [%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	0.106	0.104	0.119	0.136	0.139	0.145	0.158	0.159
1	0.149	0.134	0.153	0.150	0.149	0.166	0.206	0.201
2	0.192	0.178	0.320	0.242	0.178	0.184	0.319	0.261
4	0.213	0.185	0.239	0.187	0.357	0.170	0.393	0.353
5	0.301	0.151	0.384	0.150	0.398	0.150	0.568	0.484

循环	片段分数 [%]							
	LI 50 / 01	LI 50 / 02	LI 50 / 03	LI 50 / 04	LI 50 / 05	LI 50 / 06	LI 50 / 07	LI 50 / 08
0	0.289	0.267	0.249	0.238	0.242	0.229	0.189	0.186
1	0.108	0.098	0.108	0.091	0.120	0.108	0.107	0.130
2	0.093	0.097	0.108	0.097	0.100	0.094	0.080	0.119
4	0.119	0.126	0.130	0.135	0.120	0.106	0.116	0.105
5	0.072	0.078	0.078	0.078	0.077	0.077	0.075	0.071

## 冷冻/融化-低离子型阿达木单抗 200mg/mL

循环	单体分数 [%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08
0	99.294	99.296	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.290
1	99.286	99.267	99.259	99.256	99.120	99.254	98.999	99.126
2	99.305	99.311	99.249	99.214	99.296	99.288	99.149	99.128
4	99.303	99.272	99.261	99.301	99.296	99.283	99.004	99.061
5	99.320	99.322	99.330	99.331	99.327	99.333	98.939	98.949

循环	聚集体分数 [%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08
0	0.489	0.509	0.491	0.484	0.492	0.488	0.515	0.575
1	0.590	0.574	0.584	0.586	0.680	0.582	0.785	0.718
2	0.604	0.604	0.616	0.630	0.607	0.607	0.731	0.736
4	0.591	0.592	0.612	0.581	0.604	0.596	0.868	0.836
5	0.593	0.586	0.583	0.596	0.597	0.589	0.985	0.981

循环	片段分数 [%]							
	LI 200 / 01	LI 200 / 02	LI 200 / 03	LI 200 / 04	LI 200 / 05	LI 200 / 06	LI 200 / 07	LI 200 / 08
0	0.218	0.196	0.161	0.183	0.195	0.163	0.165	0.135
1	0.124	0.159	0.157	0.159	0.200	0.164	0.216	0.157
2	0.091	0.085	0.135	0.156	0.097	0.105	0.120	0.136
4	0.106	0.136	0.127	0.118	0.100	0.121	0.128	0.103
5	0.087	0.092	0.087	0.073	0.075	0.078	0.076	0.070

[1103]

### 冷冻/融化-商业化和在水中的阿达木单抗

循环	单体分数 [%]			
	来自实施例A, 低浓度	来自实施例A, 高浓度	标准品, 50 mg/mL	标准品, 200 mg/mL
0	99.733	99.286	99.374	99.227
1	99.689	99.212	99.375	99.215
2	99.614	99.130	99.370	99.218
4	99.489	99.029	99.361	99.196
5	99.430	98.945	99.362	99.177

循环	聚集体分数 [%]			
	来自实施例A, 低浓度	来自实施例A, 高浓度	标准品, 50 mg/mL	标准品, 200 mg/mL
0	0.186	0.635	0.358	0.502
1	0.226	0.706	0.359	0.516
2	0.304	0.780	0.364	0.513
4	0.428	0.888	0.372	0.535
5	0.485	0.971	0.373	0.553

循环	片段分数 [%]			
	来自实施例A, 低浓度	来自实施例A, 高浓度	标准品, 50 mg/mL	标准品, 200 mg/mL
0	0.080	0.079	0.268	0.272
1	0.085	0.083	0.266	0.269
2	0.082	0.090	0.266	0.269
4	0.083	0.083	0.267	0.270
5	0.085	0.085	0.265	0.269

#### [1104] 结论

[1105] 上面的实施例提供了这样的一个实验,其中对 DF/UF 处理进水(灭菌的注射用水 Ph. Eur./USP)中并用不同非离子型赋形剂配制的阿达木单抗进行冷冻/融化循环。得到的数据(在表 62 中所述)指示测试的所有制剂中蛋白的有利的总体稳定性。在 5 个冷冻/融化循环后,所有制剂含有超过 98.5%的单体物质,随着循环继续,含有微量的聚集体或片段。

#### [1106] 实施例 26:低离子型 1D4.7 溶液的冷冻/融化稳定性

[1107] 通过渗析(使用 slide-a-lyzer 盒,根据生产商的操作说明书使用, Pierce, Rockford, IL),在水中配制 1D4.7 蛋白(一种抗-IL 12/抗-IL 23IgG1),经证实重复的冷冻/融化(f/t)处理(-80°C/25°C水浴)过程中在 2mg/mL 浓度、pH 6 是稳定的。将数据与使用肠胃外蛋白制剂开发中常用的缓冲剂和赋形剂的不同制剂(2mg/mL 蛋白, pH 6)的数据进行对比。发现,在水中配制的 1D4.7 的稳定性超过在已建立的缓冲系统(例如 20mM 组氨酸, 20mM 甘氨酸, 10mM 磷酸盐或 10mM 柠檬酸盐)中配制的 1D4.7 的稳定性,甚至超过基于通用缓冲液(10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐)的含有许多种常用于稳定蛋白制剂的赋形剂(例如 10mg/mL 甘露醇, 10mg/mL 山梨醇, 10mg/mL 蔗糖, 0.01% 聚山梨醇酯 80 或 20mM NaCl)的 1D4.7 制剂的稳定性。

[1108] 应用 SEC、DLS 和颗粒计数分析来监视蛋白稳定性,并使用 1-200  $\mu$ m 测量范围的颗粒计数系统(颗粒计数器 Model 注射器, Markus Klotz GmbH, Bad Liebenzell, 德国),进行颗粒计数。实验细节如下:

[1109] ●将在水中配制的 1D4.7 与上面列出的制剂相对比

[1110] ●应用 4 个冷冻/融化循环

[1111] ● 30mL PETG 容器,约 20mL 填充量,2mg/mL 蛋白, pH6

[1112] ● 在 T0、T1(即在一个冷冻 / 融化步骤后)、T2、T3 和 T4 取样

[1113] ● 分析:目检, SEC, DLS, 在显微镜下才能看得见的颗粒测量

[1114] 图 33 显示了在重复的冷冻 / 融化循环(-80°C / 25°C) 过程中的 1D4.7 稳定性, 这通过 > 1 μm 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。在通用缓冲液(10mM 柠檬酸盐, 10mM 磷酸盐) 中配制 1D4.7, 然后测试下述赋形剂变量: 山梨醇(10mg/mL), 甘露醇(10mg/mL), 蔗糖(10mg/mL), NaCl(100mM), 和聚山梨醇酯 80(0.01%)。也在水中配制 1D4.7(通过渗析), 不加入任何赋形剂(图 33 中的“水”)。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试, 以评价材料处理、冷冻 / 融化、和取样对颗粒负载的潜在影响。

[1115] 在水中配制的 1D4.7 在冷冻 / 融化后的稳定性超过使用蛋白制剂中常用的赋形剂配制的 1D4.7 溶液的稳定性。已知甘露醇、蔗糖和山梨醇可用作冻干保护剂和 / 或冷冻保护剂, 聚山梨醇酯 80 是普遍已知在暴露于疏水 - 亲水界面(例如空气 - 水和冰 - 水) 后会增加蛋白的物理稳定性的非离子型赋形剂。

[1116] 总之, 当用常用于监视药物蛋白在冷冻 - 融化处理后的稳定性的各种分析方法(例如 SEC, 目检, 动态光散射, 和尤其是不透光度) 分析时, 在水中配制的 1D4.7 溶液表现得令人惊奇地稳定。

[1117] 实施例 27: 低离子型 13C5.5 溶液的冷冻 / 融化稳定性

[1118] 经证实在水中配制的 13C5.5(一种抗 IL-13 IgG1) 在重复的冷冻 / 融化处理(-80°C / 25°C 水浴) 过程中在 2mg/mL 浓度、pH 6 是稳定的。将数据与其它制剂(2mg/mL 蛋白, pH 6) 进行对比, 发现在水中配制的 13C5.5 的稳定性超过在常用于肠胃外蛋白制剂的缓冲系统(例如 20mM 组氨酸, 20mM 甘氨酸, 10mM 磷酸盐或 10mM 柠檬酸盐) 中配制的 13C5.5 的稳定性, 甚至超过基于通用缓冲液(10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 的含有许多种常用于蛋白制剂的赋形剂(例如 10mg/mL 甘露醇, 10mg/mL 山梨醇, 10mg/mL 蔗糖, 0.01% 聚山梨醇酯 80, 20mM NaCl, 200mM NaCl) 的 13C5.5 制剂的稳定性。

[1119] 以与上面的实施例所述类似的方式, 进行样品制备、实验处理、取样和样品分析。

[1120] ● 将在水中配制的 13C5.5 与上面列出的制剂相对比

[1121] ● 应用 4 个冷冻 / 融化循环

[1122] ● 30mL PETG 容器

[1123] ● 2mg/mL, pH6

[1124] ● 在 T0、T1、T2、T3 和 T4 取样

[1125] ● 分析:目检, SEC, DLS, 在显微镜下才能看得见的颗粒测量

[1126] 图 34 显示了在重复的冷冻 / 融化循环(-80°C / 25°C) 过程中的 13C5.5 稳定性, 这通过 > 10 μm 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。在 10mM 磷酸盐缓冲液、10mM 柠檬酸盐缓冲液、20mM 甘氨酸缓冲液和 20mM 组氨酸缓冲液中配制 13C5.5。也在本发明的制剂中配制 13C5.5(通过渗析), 不加入任何赋形剂。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试, 以评价材料处理、冷冻 / 融化、和取样对颗粒负载的潜在影响(称作空白)。

[1127] 在水中配制的 13C5.5 在冷冻 / 融化后的稳定性超过在常用于蛋白制剂的缓冲液

中配制的 13C5.5 溶液的稳定性。使用其它分析方法（例如 SEC, 目检, 等）, 没有观察到在水中配制的 13C5.5 溶液的不稳定性。

[1128] 图 35 显示了在重复的冷冻 / 融化循环 (-80°C / 25°C) 过程中的 13C5.5 稳定性, 这通过 > 1 μm 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。在通用缓冲液 (10mM 柠檬酸盐, 10mM 磷酸盐) 中和在含有下述赋形剂变量的通用缓冲液中配制 13C5.5 : 山梨醇 (10mg/mL), 甘露醇 (10mg/mL), 蔗糖 (10mg/mL), NaCl (200mM), NaCl (20mM) 和聚山梨醇酯 80 (0.01%)。也在水中配制 13C5.5 (通过渗析), 不加入任何赋形剂, 用于对比 (纯水)。也对注射用水进行冷冻 / 融化循环和在显微镜下才能看得见的颗粒测试, 以评价材料处理、冷冻 / 融化、和取样对颗粒负载的潜在影响。

[1129] 在水中配制的 13C5.5 在冷冻 / 融化后的稳定性超过使用常用于蛋白制剂的赋形剂配制的 13C5.5 溶液的稳定性。已知甘露醇、蔗糖和山梨醇可用作冻干保护剂和 / 或冷冻保护剂, 聚山梨醇酯 80 是普遍已知在暴露于疏水 - 亲水界面 (例如空气 - 水和冰 - 水) 后会增加蛋白的物理稳定性的非离子型赋形剂。发现在配制进本发明的制剂中的 13C5.5 样品中的低数目的在显微镜下才能看得见的颗粒是在令人惊奇的低水平, 证实了这种制剂的高安全性和稳定性潜力。

[1130] 使用其它分析方法 (例如 SEC, 目检, 等), 没有观察到在水中配制的 13C5.5 溶液的不稳定性。

[1131] 如上所述进行冷冻 / 融化程序后 13C5.5 溶液的 DLS 分析。来自 DLS 分析的结果表明, 含有 0.01% 吐温 -80 的 13C5.5 溶液在仅 1 个冷冻 / 融化步骤后含有显著的高分子量 (HMW) 聚集体形式, 而在水中的 13C5.5 不含有 HMW 聚集体形式, 甚至在应用 3 个冷冻 / 融化步骤后。

[1132] 总之, 当用常用于监视药物蛋白在冷冻 - 融化处理后的稳定性的各种分析方法 (例如 SEC, 目检, 动态光散射, 和尤其是不透光度) 分析时, 在水中配制的 13C5.5 溶液表现得令人惊奇地稳定。

[1133] 实施例 28 : 低离子型 7C6 溶液的冷冻 / 融化稳定性

[1134] 经证实在水中配制的 7C6 (一种抗淀粉状蛋白 β IgG1) 在重复的冷冻 / 融化处理 (-80°C / 30°C 水浴) 过程中在 2mg/mL 浓度、pH 6 是稳定的。将数据与其它制剂 (2mg/mL 蛋白, pH 6) 进行对比, 发现在水中配制的 7C6 的稳定性超过在常用于肠胃外蛋白制剂的缓冲系统中配制的 7C6 的稳定性, 甚至超过基于通用缓冲液 (10mM 磷酸盐, 10mM 柠檬酸盐) 的含有许多种常用于蛋白制剂的赋形剂的 7C6 制剂的稳定性。

[1135] 评价下述溶液组合物在冷冻 / 融化实验过程中维持 7C6 物理稳定性的潜力 :

[1136] ● 磷酸盐缓冲液, 15mM

[1137] ● 柠檬酸盐缓冲液, 15mM

[1138] ● 琥珀酸盐缓冲液, 15mM

[1139] ● 组氨酸缓冲液, 15mM

[1140] ● 精氨酸缓冲液, 15mM

[1141] ● 低离子型蛋白制剂, 不加入赋形剂

[1142] ● 通用缓冲液, 山梨醇 (10mg/mL)

[1143] ● 通用缓冲液, 甘露醇 (10mg/mL)

- [1144] ●通用缓冲液,蔗糖 (10mg/mL)
- [1145] ●通用缓冲液,海藻糖 (10mg/mL)
- [1146] ●通用缓冲液,0.01% (w/w) 聚山梨醇酯 80
- [1147] 以与实施例 26 和 27 所述非常类似的方式,进行样品制备、实验处理、取样和样品分析。
- [1148] ●将在水中配制的 7C6 与上面列出的制剂相对比
- [1149] ●应用 4 个冷冻 / 融化循环
- [1150] ●30mL PETG 容器,约 20mL 填充
- [1151] ●2mg/mL, pH6
- [1152] ●在 T0、T1、T2、T3 和 T4 取样
- [1153] ●分析:通过下述方法,评估 A $\beta$ - 抗体稳定性:
- [1154] ■在聚丙烯圆底试管中进行蛋白溶液的目检,其中装入的样品用于不透光度测量。在黑色和白色背景前小心地检查指示蛋白物理不稳定性(例如朦胧、浊度和颗粒形成)的迹象。
- [1155] ■动态光散射 (eZetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, AI9494 ;配有 Hellma 精密格, suprasil quartz, 类型 105.251-QS, 光程 3mm, 中心 Z8.5mm, 至少 60  $\mu$ L 样品填充, 聚丙烯圆底试管中从不透光度测量剩余的蛋白样品用于 DLS 测量)。进行自动化测量(每个样品测量 1 次)。
- [1156] ■不透光度分析。在层流条件下,将 3.5mL 样品装入 5mL 圆底试管,在起始 0.8mL 冲洗后,在  $n = 3$  模式进行测量(每单次测量 0.8mL)。
- [1157] ■尺寸排阻色谱,组合 UV<sub>214</sub>/UV<sub>280</sub>和多角度光散射。流动相:100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/200mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.0(将 49.68g 无水磷酸氢二钠和 99.44g 无水硫酸钠溶于约 3300mL Milli-Q 水,使用 1M 磷酸将 pH 调至 7.0,用 Milli-Q 水填充至 3500mL 的体积,经过膜过滤器过滤溶液)。SEC 柱,TSK 凝胶 G3000SW(目录号 08541)7.8mmx30cm,5  $\mu$ m,配有 TSK 凝胶保护器(目录号 08543)6.0mmx4.0cm,7  $\mu$ m。流速 0.3mL/min,注射体积 20  $\mu$ L(相当于 20  $\mu$ g 样品),柱温度室温,自动取样器温度 2-8 $^{\circ}$ C,试验时间 50 分钟,梯度等梯度(isocratic),用 10% 异丙醇冲洗活塞,通过紫外吸光度检测,二极管阵列检测器:波长 214nm,峰宽 > 0.1min,带宽:8nm,参照波长 360nm,带宽 100nm
- [1158] 图 36 显示了在重复的冷冻 / 融化循环 (-80 $^{\circ}$ C / 25 $^{\circ}$ C) 过程中的 7C6 稳定性,这通过 > 1  $\mu$ m 的在显微镜下才能看得见的颗粒的形成来反映。对于许多制剂而言,在冷冻 / 融化后在水中配制的 7C6 的稳定性超过在常用于蛋白制剂的缓冲液中配制的 7C6 溶液的稳定性。使用其它分析方法(例如 SEC, 目检, 动态光散射),没有观察到在水中配制的 7C6 溶液的不稳定性。
- [1159] 令人惊奇地,在冷冻 / 融化后在水中配制的 7C6 的稳定性超过使用常用于蛋白制剂的赋形剂配制的 7C6 溶液的稳定性。已知甘露醇、蔗糖和山梨醇可用作冻干保护剂和 / 或冷冻保护剂,聚山梨醇酯 80 是普遍已知在暴露于疏水-亲水界面(例如空气-水和冰-水)后会增加蛋白的物理稳定性的非离子型赋形剂。发现在配制进本发明的制剂中的 7C6 样品中的低数目的在显微镜下才能看得见的颗粒是在令人惊奇的低水平,证实了这种制剂的高安全性和稳定性潜力。

[1160] 总之,当用常用于监视药物蛋白在冷冻-融化处理后的稳定性的各种分析方法(例如 SEC,目检,动态光散射,和尤其是不透光度)分析时,在水中配制的 7C6 溶液表现得令人惊奇地稳定。

[1161] 实施例 29:在水中配制的 J695 的制备和其稳定性研究

[1162] 材料和方法

[1163] 将 427.1g (80mg/mL) J695 稀释至 40mg/mL,并使用纯化水渗滤。用纯化水进行 5-倍体积交换(理论的赋形剂减少,99.3%)后,将蛋白溶液超滤至 100mg/mL 的目标浓度。进行 pH、重量摩尔渗透压浓度、密度、目检和蛋白浓度测量(OD280),以监视 DF/UF 处理后蛋白的状态。

[1164] DF/UF 处理后,将蛋白溶液无菌过滤(0.22  $\mu$ m Sterivex GV 膜过滤器)进 60mL PETG 瓶子(Nalgene),随后在 -80°C 保存 3 个月。

[1165] 在 37°C 融化后,将溶液无菌过滤(0.22  $\mu$ m Sterivex GV 膜过滤器),装入无菌的 BD Hypak Physiolis SCF™ 1mL 长注射器 29G,1/2 英寸,5-斜面,RNS TPE,用 BD Hypak SCF™ 1ml W4023/50Flur Daikyo 无菌塞封闭。填充体积是每个注射器 1.000mL。

[1166] 填充后,将注射器分别保存在 2-8°C 和 40°C,按照下面所述的取样计划的指示进行分析。

[1167] ■ J695 药品(在 280nm 的消光系数:1.42mL/mg cm):药品,pH 6.0,不含有聚山梨醇酯 80

[1168] ■ Sartorius Sartocon Slice 渗滤系统,配有 Ultraset PES 膜盒(50kDa 截止)。根据 Sartorius 操作说明书,在环境温度,以连续模式操作 Sartocon Slice 系统。

[1169] ■ pH 电极

[1170] ■ Perkin Elmer UV/Vis 分光光度计, $\lambda$  25,用于蛋白浓度测量(280nm 波长)。一次性紫外比色皿,1.5mL,半微量,用于浓度测量。

[1171] ■ 0.22  $\mu$ m 过滤过的纯化水用作 DF/UF 介质。

[1172] ■ Anton Paar 密度计 DMA 4100 用于密度测量

[1173] ■ Knauer 渗透压计类型 ML 用于重量摩尔渗透压浓度测量(用 400mOsmol/kg NaCl 校准溶液校正,产品号 Y1241,Herbert Knauer GmbH,Berlin,德国)。

[1174] 分析方法

[1175] ■ J695,SEC 分析:Superdex 200 柱(Pharmacia)。流动相 92mM 磷酸氢二钠,211mM 硫酸钠,pH 7.0,0.75mL/min 流速,环境温度,检测紫外线 214nm。每个样品用流动相稀释至 2.0mg/mL,样品注射负载 20  $\mu$ g(一式两份注射)。

[1176] ■ J695,IEC 分析:Dionex,Propac WCX-10 柱以及对应的保护柱。分离条件:流动相 A:20mM 磷酸氢二钠和 20mM 醋酸钠,pH 7.0;流动相 B 20mM 磷酸氢二钠,400mM 氯化钠,pH 5.0。1.0mL/min 流速,环境温度。每个样品用 Milli-Q 水稀释至 1.0mg/mL,样品注射负载 100  $\mu$ g(一式两份注射)。

[1177] ■ J695,SDS-PAGE 分析:Novex 丙烯酰胺平板凝胶(8-16%用于非还原条件,12%用于还原条件,Invitrogen),考马斯染色(Invitrogen)。使用由 10x 原液(Invitrogen)制备的 Tris-甘氨酸缓冲液,在还原( $\beta$ -巯基乙醇)和非还原条件下进行分离。

[1178] ■ J695,缓冲液组分的定量:

[1179] ●甘露醇:经 ReproGel Ca 柱 (Maisch 博士, 德国) 分离, RI 检测, 流动相:去离子水, 0.6mL/min 流速, 20 μL 样品注射。使用外部校正标准曲线进行定量。

[1180] ●组氨酸和蛋氨酸:用 OPA(邻苯二甲醛) 荧光标记氨基酸, 经 ReproSil ODS-3 柱 (Maisch 博士, 德国) HPLC 分离, 在 420nm 荧光检测 (在 330nm 消光), 流动相 A:70% 柠檬酸 (10.51g/L) 缓冲液, pH 6.5, 30% 甲醇, 流动相 B:甲醇, 1.0mL/min 流速, 20 μL 样品注射。使用外部校正标准曲线进行定量。

[1181] ■ J695, PCS 分析:使用 A Malvern Instruments Zetasizer nano ZS, 在 173 度角, 在 25°C, 在一次性塑料比色皿中, 在 100mg/mL 不经稀释, 假定溶液粘度 4.3875mPas, 蛋白折光率 1.450, 缓冲溶液折光率 1.335。报道 20 次扫描、每次 20 秒的平均结果。

[1182] 蛋白浓度的计算

[1183] 计算公式:

$$[1184] \quad E = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \rightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \times d}$$

[1185]  $\varepsilon$  ——吸收系数

[1186]  $c$  ——浓度

[1187]  $d$  ——光必须穿过的比色皿长度

[1188]  $E$  ——吸光度

[1189]  $I_0$  ——起始光强度

[1190]  $I$  ——穿过样品后的光强度

$$[1191] \quad \varepsilon_{J695} = 1.42 \frac{mL}{mg \times cm}$$

[1192] 取样计划

[1193] 在下面列出的温度保存制备的溶液的样品, 并在研究开始后指定的时间点取样 (x) (表 63)。实验参数和方法如表 64 所述。

[1194] 表 63

[1195]

温度	T0	1 m	3 m	6 m
5°C	x	x	x	x
40°C		x	x	x

[1196] 表 64

[1197]

测试参数	测试方法
外观	目检
肉眼可见颗粒	相似 DAC (EA 4.43)
在显微镜下才能看得见的颗粒	相似 Ph.Eur./USP EA 4.44
澄清晰度	Ph.Eur. (EA 4.42)
颜色 (目检)	Ph.Eur. (EA 4.50)
pH	Ph.Eur. (EA 4.24)
尺寸排阻HPLC	见上面
阳离子交换HPLC	见上面
SDS-PAGE	见上面
PCS	见上面

[1198] J695 的 DF/UF 处理

[1199] 表 65 提供了渗滤后 J695 状态。

[1200] 表 65

[1201]

样品	蛋白浓度 [mg/mL]	pH	重量摩尔 渗透压浓度 [mosmol/kg]	目检
DF/UF后	107	6.4	10	轻微乳色, 轻微黄色, 基本上没有肉眼可见颗粒

[1202] DF/UF 后, 定量地监视起始缓冲液组分的浓度, 以评估 DF 功效。发现所有结果都低于对应的分析方法 (对于甘露醇, HPLC 和 RI, 对于 OPA 标记后的蛋氨酸和组氨酸, 荧光检测) 的实践检出限 (参见表 66)。

[1203] 表 66

[1204]

样品	蛋氨酸 [mg/mL]	组氨酸 [mg/mL]	甘露醇 [mg/mL]
DF/UF前	0.669	0.586	18.36
DF/UF后	< 0.13	< 0.14	< 3.20

[1205] 保存后 J695 表征。下表 67 支持了在保存后 100mg/mL 的 DF/UF 的 J695 的稳定性。

[1206]

实验标准	说明	实验持续时间 [月]	保存条件 [°C/%RH]	
			+5	+40/75
外观	溶液	起始	遵守	
		1	遵守	遵守 5
		3	遵守	遵守
		6	遵守	遵守
澄清度	报告结果， 与根据Ph. Eur. 的 参照悬浮液相比	起始	≤ RSII	
		1	-	-
		3	≤ RSII	≤ RSII
		6	≤ RSII	≤ RSIII 10
颗粒污染肉眼 可见颗粒	报告结果，目检评分  (测试的样品数)	起始	2.0 (1)	
		1	2.0 (1)	3.0 (1)
		3	1.6 (5)	1.0 (5)
		6	1.1 (9)	1.6 (9)
颗粒污染在 显微镜下才能 看得见的颗粒	≥ 10 μm : ≤ 6000 颗粒每容器  ≥ 25 μm : ≤ 600 颗粒每容器	起始 ≥ 10 μm ≥ 25 μm	290 16	
		1 ≥ 10 μm ≥ 25 μm	-	-
		3 ≥ 10 μm ≥ 25 μm	-	-
		6 ≥ 10 μm ≥ 25 μm	124 1	54 3
尺寸排阻HPLC	对于以下报告结果 (%) 聚集体 (A) 单体 (M) 片段 (F)	起始 A M F	0.9 98.9 0.2	
		1 A M F	0.8 99.0 0.1	2.3 97.1 0.6
		3 A M F	1.0 98.8 0.1	3.4 95.1 1.4
		6 A M F	1.4 98.4 0.1	5.5 85.6 8.9

[1207]

实验标准	说明	实验持续时间 [月]	保存条件 [°C/%RH]	
			+5	+40/75
SDS-PAGE (非还原条件)	主要带型与 参照标准相当	起始	遵守	
		1	遵守	遵守
		3	遵守	遵守
		6	遵守	遵守
SDS-PAGE (还原条件)	主要带型与 参照标准相当	起始	遵守	
		1	遵守	遵守
		3	遵守	遵守
		6	遵守	遵守
PCS	对于Z-平均值[nm] 和PDI报告结果	起始	0.9 0.23	
		1	0.9 0.23	1.0 0.23
		3	0.9 0.23	1.1 0.24
		6	0.9 0.23	1.3 0.29
阳离子交换HPLC	对于以下报告结果(%) 酸性物质(A) 主要同种型(M) 碱性物质(B)	起始	5.9 91.5 2.5	
		1	5.6 92.0 2.4	10.6 98.9 0.5
		3	5.7 92.1 2.1	14.4 85.0 0.6
		6	6.0 91.6 2.3	29.6 69.4 1.0

## [1208] 结论

[1209] 上面的实施例提供了渗滤/超滤(DF/UF)实验,其中将水(0.22 μm过滤过的纯化水)用作单克隆抗体J695的渗滤介质。

[1210] 使用纯水作为DF/UF交换介质,对J695进行DF/UF处理,并在约pH 6.4在高浓度(100mg/mL)配制,没有诱发溶液朦胧、严重乳色或浊度形成。

[1211] 将来自DF/UF实验的J695在SCF注射器中在2-8°C和40°C保存最高达6个月。得到的数据指向蛋白的有利的总稳定性。

[1212] 总之,使用纯水作为DF/UF交换介质来处理和配制蛋白是可行的。假定理论的100%赋形剂膜渗透性,可以估计约99.3%最大赋形剂减少。特定方法给出的证据表明,DF/UF后,赋形剂浓度低于实践检出限。

[1213] 实施例 30 :高浓度阿达木单抗水溶液的冷冻 / 融化特性和稳定性测试——同质性和物理稳定性

[1214] 低 - 离子型阿达木单抗溶液的制备

[1215] 在 25°C 在水浴中融化在 2L PETG 瓶子中的 1.6L 药品 (DS) 材料,均质化,并使用注射用水作为渗滤交换介质,进行 DF/UF。通过应用下述参数,使用 Sartorius Sartocon Slice 装置,在连续模式进行渗滤:

[1216] ● 泵输出 :8%

[1217] ● 入口压力 :最大 1bar (0.8bar)

[1218] ● 膜 :2x PES,截止 50kD

[1219] 在渗滤过程中,5- 倍体积交换足以使重量摩尔渗透压浓度降低至 8mOsmol/kg。

[1220] 在渗滤之前 (SEC,通过 OD280 测定蛋白浓度, pH,重量摩尔渗透压浓度和密度) 和渗滤之后 (通过 OD280 测定蛋白浓度, pH,重量摩尔渗透压浓度和密度),取出过程中控制 (IPC) 样品。IPC- 样品不是无菌的。

[1221] 渗滤后,用注射用水将在水中配制的 ~ 70mg/mL 阿达木单抗稀释至 50mg/mL,将 pH 值调至 5.2。

[1222] 将 1.6L 在水中配制的阿达木单抗 50mg/mL pH 5.2 重新装入 2L PETG 瓶子。对剩余体积的阿达木单抗溶液进行 DF/UF,使浓度增加至 100mg/mL。

[1223] 无菌过滤在水中配制的阿达木单抗 100mg/mL pH 5.3,将 0.8L 装入 1L PETG 瓶子。

[1224] 分析

[1225] ● 尺寸排阻色谱 (SEC)

[1226] ● pH- 测量

[1227] ● 重量摩尔渗透压浓度测量

[1228] ● 密度测量

[1229] ● 通过 OD280 测定蛋白浓度

[1230] ● 光学外观

[1231] ● 离子交换色谱 (IEC)

[1232] 阿达木单抗 1L 容器的冷冻 / 融化实验

[1233] 将在 1L PETG 容器中的在水中配制的阿达木单抗 100mg/mL 预冷至 2-8°C,然后在 -80°C 冷冻,冷冻循环 >12 小时。在 25°C 在水浴中连续融化在 1L PETG 瓶子中的冷冻样品。在融化过程中,冷冻溶液的瓶子浸泡在水浴中最高达液体水平。融化后,不经均质化立即,和在上下翻转 15 和 30 次均质化后,取出下述样品。

[1234] 表 68 :取样计划:

[1235]

	每个瓶子翻转数	样品	分析实验
1	0	5 mL 顶部	蛋白含量, 重量摩尔渗透压浓度, PH, 密度, SEC
2	0	5 mL 中间	
3	0	5 mL 底部	
4	15	5 mL 顶部	蛋白含量, 重量摩尔渗透压浓度, PH, 密度, SEC
5	15	5 mL 中间	
6	15	5 mL 底部	
7	30	5 mL 顶部	蛋白含量, 重量摩尔渗透压浓度, PH, 密度, SEC和在显微镜下才能看得见的颗粒
8	30	5 mL 中间	
9	30	5 mL 底部	

[1236] 阿达木单抗溶液的表征

[1237] 在水中配制的阿达木单抗 50mg/mL 和 100mg/mL 每次表现澄清, 浅黄色, 非乳色, 轻轻移动后没有波型。

[1238] 也在冷冻和融化后, 在水中配制的阿达木单抗没有改变外观 (刚刚融化后, 和也在 15 和 30 次上下翻转后)。

[1239] 刚刚融化后轻轻移动瓶子后, 和在刚刚融化后取样过程中将针浸入溶液中后, 观察到轻微的波型。

[1240] 不同于在商业缓冲液中用阿达木单抗进行的类似实验, 在水中的阿达木单抗溶液 50mg/mL 没有显示出蛋白浓度、密度和重量摩尔渗透压浓度的任何梯度。

[1241] 阿达木单抗溶液 100mg/mL 也没有显示出蛋白浓度、密度和重量摩尔渗透压浓度的任何梯度。

[1242] 分别在 -30°C 和 -80°C 储存 6 个月后, 评估稳定性。

[1243] 在下文中, 描述了各个分析数据:

[1244] 表 69 : 冷冻 / 融化处理之前的阿达木单抗 50 和 100mg/mL

[1245]

	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	重量摩尔 渗透压浓度 mOsmol/kg	蛋白含量 (重量分析) mg/mL	在显微镜下才能看得见的颗粒		
					1mL ≥1μm	1mL ≥10μm	1mL ≥25μm
在水中 50mg/mL	5.18	1.0121	5	49.3	7953	5	0
在水中 100mg/mL	5.32	1.0262	12	99.8	154	4	2

[1246] 表 70 : 冷冻 / 融化处理后在水中配制的阿达木单抗 50mg/mL, pH5.2

[1247]

翻转数	样品	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	重量摩尔 渗透压浓度 mOsmol/kg	蛋白含量 mg/mL	纯度 (SEC) %	在显微镜下才能看得见的颗粒		
							1mL ≥1μm	1mL ≥10μm	1mL ≥25μm
0	顶部	5.20	1.0119	6	48.7	99.597	-	-	-
0	中间	5.19	1.0120	8	49.4	99.576	-	-	-
0	底部	5.17	1.0120	6	49.8	99.649	-	-	-
15	顶部	5.20	1.0120	4	49.7	99.649	-	-	-
15	中间	5.18	1.0120	5	49.2	99.678	-	-	-
15	底部	5.17	1.0120	4	49.1	99.637	-	-	-
30	顶部	5.19	1.0120	5	49.7	99.647	1280	4	0
30	中间	5.17	1.0120	3	50.4	99.637	2055	13	0
30	底部	5.18	1.0120	6	48.9	99.611	3889	37	11

[1248] 表 71 :冷冻 / 融化处理后在水中配制的阿达木单抗 100mg/mL, pH 5.2

[1249]

翻转数	样品	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	重量摩尔 渗透压浓度 mOsmol/kg	蛋白含量 mg/mL	纯度 (SEC) %	在显微镜下才能看得见的颗粒		
							1mL ≥1μm	1mL ≥10μm	1mL ≥25μm
0	顶部	5.29	1,0259	13	98,7	99,424	-	-	-
0	中间	5,3	1,0262	16	99,9	99,468	-	-	-
0	底部	5,28	1,0262	14	101,2	99,48	-	-	-
15	顶部	5,27	1,0261	13	98,9	99,511	-	-	-
15	中间	5,27	1,0261	16	97,7	99,466	-	-	-
-	底部	5,28	1,0261	15	97,0	99,483	-	-	-
30	顶部	5,29	1,0261	16	96,6	99,439	231	58	49
30	中间	5,28	1,0261	16	97,0	99,467	169	21	9
30	底部	5,28	1,0261	16	99,3	99,476	131	3	1

[1250] 表 72 :在水中配制的阿达木单抗 100mg/mL pH 5.2 储存后的稳定性

[1251]

测试时间点	SEC 聚集体 单体片段	赖氨酸 同种型的 IBC总和	肉眼 可见外观	在显微镜下才能看得见的颗粒(1 mL)		
				≥1μm	≥10μm	≥25μm
T 0	0,55 99,40 0,05	85,523	澄清, 无颗粒物	155	3	1
T 6个月, -80°C	0,47 99,39 0,14	82,124	澄清, 无颗粒物	210	8	5
T 6个月, -30°C	1,28 98,58 0,14	81,61	澄清, 无颗粒物	171	71	51

[1252] 结论

[1253] 应用分析方法观察到,在冷冻 / 融化处理后,和在  $-30^{\circ}\text{C}$  或  $-80^{\circ}\text{C}$  储存最高达 6 个月,50 和 100mg/mL 的在水中配制的阿达木单抗没有显著的不稳定性。

[1254] 实施例 31 :低离子型制剂中阿达木单抗的冷冻和融化过程——包括蛋白含量的过程设计空间

[1255] 溶液的制备

[1256] 在  $23^{\circ}\text{C}$  循环水浴中融化阿达木单抗 BDS ( 本体药品 )。将溶液向上浓缩至 100mg/ml 的目标浓度,其目的是使用超滤 / 渗滤 (UF/DF) 方法 (Pellicon" Mini" 2) 减小体积。将 2 盒含有 Biomax 10K 聚醚砜的 Millipore Pellicon 2 切向流 mini- 盒装进 Pellicon 2 单元。在处理开始时,在 60ml/min 测量流速,进料压是 21psi。在 111.3mg/ml 蛋白浓度,停止处理。

[1257] Spectra/Por 分子多孔膜管道用于渗析 ( 直径 48mm,18ml/cm 体积,75cm 长 )。将 8L 体积的阿达木单抗 100mg/ml pH 5.2 转移至 8 个渗析试管。每个试管装有 1L 阿达木单抗 100mg/ml。将 4 个试管 ( 等于 4L 溶液 ) 置于装有 36L 注射用水的容器中,即实现 1 : 10 的溶液交换倍数。使溶液达到平衡,然后相对新鲜的注射用水交换体积。重复溶液交换 5 次,直到达到 1 : 100,000 的总溶液交换倍数。

[1258] 通过渗析彻底交换溶液后,通过第二个 UF/DF 步骤向上浓缩。象第一步骤一样,进行第二个 UF/DF 步骤。达到低离子型制剂中 247.5mg/ml 阿达木单抗的终浓度。用已经含有聚山梨醇酯 80 的原料进行 UF/DF。可以预见到,在最后的蛋白溶液中积累的聚山梨醇酯 80 导致高于 0.1% 的聚山梨醇酯含量。

[1259] 根据需要,用 WFI 稀释向上浓缩的 247.5mg/ml 阿达木单抗本体溶液至更低蛋白浓度水平  $-200\text{mg/ml}$ ,  $175\text{mg/ml}$ ,  $150\text{mg/ml}$ ,  $140\text{mg/ml}$ ,  $130\text{mg/ml}$ ,  $120\text{mg/ml}$ ,  $100\text{mg/ml}$ ,  $80\text{mg/ml}$ ,  $50\text{mg/ml}$ ,  $40\text{mg/ml}$ , 和  $25\text{mg/ml}$ 。所有实验的瓶子填充体积是 1600ml。

[1260] 冷冻程序

[1261] 在该评价中使用一系列逐渐增加的冷冻速率 :超低温冷冻机底架 < 超低温冷冻机中间架 < 超低温冷冻机顶架 << 干冰。

[1262]  $< -70^{\circ}\text{C}$  冷冻机用于实验 ( 容量 :20.2Cu. Ft. (572 升) )。使用 3 个架子。每个负载 9 个 2L PETG 瓶子。在置于冷冻机中之前,在室温保存瓶子。冷冻持续至少 48 小时。对于设计空间评价,选择 3 个具有逐渐增加的冷冻速率的位置。底架上的前面位置用于最慢的冷冻速率。快一些的冷冻速率是在中间架的中心位置。冷冻机设置中最快的冷冻速率是在顶架的后 / 右位置。

[1263] 对于通过干冰冷冻,一个瓶子完全用干冰围绕至少 8 小时。在 Styrofoam 盒子中,给瓶子覆盖一层干冰 ( 约 3-5cm 厚 )。一个瓶子站立在干冰层顶部。因此,给瓶子和 styrofoam 盒子内壁之间的空间填充干冰,直到覆盖除了盖子以外的每个表面。冷冻时间后,取出瓶子,立即融化或置于  $-70^{\circ}\text{C}$  冷冻机中保存。

[1264] 融化程序

[1265] 在该评价中使用一系列融化速率 : $4^{\circ}\text{C}$  冷风 <<  $23^{\circ}\text{C}$  水浴 <  $37^{\circ}\text{C}$  水浴。

[1266] 分析

[1267] 进行下述分析来表征样品 :

[1268] ● 重量摩尔渗透压浓度

[1269] ●电导率

[1270] ●pH

[1271] ●密度

[1272] ●通过直接 UV (280nm) 测定蛋白浓度

[1273] 对于浓度实验,用水稀释样品,直到达到 $< 1.2$ 的吸光度。使用阿达木单抗分子在280nm的吸收系数1.39。

[1274] 阿达木单抗溶液的表征

[1275] 瓶子绘图研究揭示出趋向瓶子体积中梯度形成的轻微趋势。特别对于更慢的冷冻和融化速率,在接近瓶子底部检测到更高的蛋白浓度。该现象也反映在电导率、密度和重量摩尔渗透压浓度数据中。在所有测试条件下,pH在实践中表现恒定。

[1276] 在以前的关于在超低温冷冻机中为基于瓶子的系统冷冻和融化设计空间的研究中,发现沉降的出现是决定可允许的操作范围的边界的主要失败模式。在该研究中,没有观察到该边界,尽管研究的设计空间覆盖非常宽的范围。该产物的独特行为也反映在在该冷冻和融化过程中非常低的形成浓度梯度的趋势中。在以前的研究中得出的结论是,产物和过程固有的梯度形成是在某些过程条件下出现沉淀的原因。结果,可以确定,从过程观点看,该系统对于最高达247.5mg/ml的本体药品浓度的低离子型制剂pH 5中的阿达木单抗是可行的。研究的阿达木单抗水制剂令人惊奇地表现出比其它测试的阿达木单抗制剂优秀的性能。

[1277] 表73:在含低离子型制剂中的新鲜融化(23°C水浴)的100mg/ml阿达木单抗的瓶子中的蛋白浓度、电导率、重量摩尔渗透压浓度、密度和pH分布

[1278] 冷冻和融化条件:-70C 顶部 /23C 融化

[1279]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	40	11	0.61	5.43	1.021	78.0
2	210	14	0.67	5.43	1.024	92.2
3	225	15	0.70	5.43	1.0253	98.1
4	200	17	0.72	5.46	1.0259	103.9
5	175	18	0.73	5.43	1.0268	100.2
6	180	18	0.74	5.43	1.0275	100.9
7	230	20	0.80	5.46	1.0284	109.1
8	180	22	0.81	5.45	1.0294	111.2
9	150	21	0.82	5.44	1.0307	118.0

[1280] 冷冻和融化条件:-70C 中间 /23C 融化

[1281]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	30	8	0.54	5.43	1.0174	65.3
2	175	18	0.68	5.44	1.0235	91.3
3	200	17	0.70	5.44	1.0245	92.1
4	185	17	0.72	5.44	1.0249	102.9
5	200	18	0.71	5.43	1.0248	95.6
6	200	20	0.73	5.44	1.0262	96.6
7	175	20	0.74	5.44	1.0283	107.5
8	180	20	0.77	5.45	1.0306	116.1
9	200	26	0.82	5.44	1.0346	131.1

[1282] 冷冻和融化条件：-70C 底部 /23C 融化

[1283]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	35	9	0.60	5.41	1.0195	73.2
2	200	13	0.68	5.41	1.0231	89.6
3	225	16	0.70	5.41	1.0241	93.2
4	180	15	0.71	5.41	1.0246	96.8
5	200	15	0.72	5.40	1.0249	95.7
6	200	19	0.73	5.41	1.0259	96.4
7	185	21	0.75	5.42	1.0272	102.6
8	200	26	0.79	5.41	1.0309	116.8
9	175	31	0.85	5.42	1.0372	141.5

[1284] 表 74：在含低离子型制剂中的新鲜融化（23℃水浴）的 140mg/ml 阿达木单抗的瓶子中的蛋白浓度、电导率、重量摩尔渗透压浓度、密度和 pH 分布

[1285] 冷冻和融化条件：-70C 顶部 /23C 融化

[1286]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	50	36	0.87	5.43	1.0338	130.0
2	215	42	0.90	5.43	1.0354	139.9
3	170	54	0.91	5.43	1.0362	144.9
4	210	41	0.84	5.44	1.0365	141.5
5	200	40	0.93	5.43	1.0364	157.7
6	200	41	0.92	5.43	1.0364	140.0
7	190	41	0.92	5.43	1.0363	143.4
8	180	44	0.82	5.43	1.037	150.1
9	140	45	0.95	5.41	1.038	148.3

[1287] 冷冻和融化条件：-70C 中间 /23C 融化

[1288]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	25	32	0.81	5.45	1.0284	112.0
2	175	34	0.84	5.44	1.0307	122.4
3	175	36	0.88	5.44	1.033	133.9
4	200	40	0.90	5.43	1.0342	134.6
5	220	40	0.92	5.43	1.0351	140.9
6	185	45	0.94	5.43	1.0369	143.6
7	210	47	0.97	5.43	1.0384	149.8
8	175	47	0.99	5.43	1.0399	160.3
9	190	48	1.01	5.43	1.0435	168.3

[1289] 冷冻和融化条件：-70C 底部 /23C 融化

[1290]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	75	28	0.75	5.45	1.0257	88.7
2	180	34	0.82	5.46	1.029	111.6
3	175	34	0.84	5.44	1.0313	123.5
4	220	37	0.86	5.44	1.0322	118.8
5	165	38	0.89	5.45	1.0337	126.3
6	215	44	0.95	5.45	1.0374	137.6
7	210	49	1.00	5.45	1.0407	149.6
8	150	53	1.03	5.43	1.0429	154.9
9	180	60	1.06	5.44	1.0501	183.2

[1291] 表 75：在含低离子型制剂中的新鲜融化（37℃水浴）的 200mg/ml 阿达木单抗的瓶子中的蛋白浓度、电导率、重量摩尔渗透压浓度、密度和 pH 分布

[1292] 冷冻和融化条件：-70C 顶部 /37C 融化

[1293]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	40	37	0.89	5.26	1.0573	197.5
2	210	35	0.96	5.24	1.0573	195.3
3	175	34	0.96	5.22	1.0578	200.3
4	210	36	0.88	5.27	1.0579	193.9
5	210	39	0.89	5.24	1.058	210.6
6	190	39	0.84	5.27	1.058	213.8
7	200	41	0.88	5.27	1.058	206.7
8	170	41	0.88	5.24	1.0581	196.6
9	160	39	0.89	5.29	1.0595	201.9

[1294] 冷冻和融化条件：-70C 中间 /37C 融化

[1295]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	10	31	0.85	5.29	1.0485	170.2
2	185	35	0.89	5.31	1.0505	189.3
3	215	37	0.90	5.33	1.0518	191.7
4	185	38	0.89	5.27	1.0519	191.8
5	200	36	0.90	5.32	1.0528	196.3
6	200	48	0.90	5.28	1.0533	189.3
7	170	37	0.90	5.23	1.0536	193.1
8	215	39	0.91	5.33	1.0552	202.1
9	180	48	0.92	5.31	1.0613	225.5

[1296] 冷冻和融化条件：-70C 底部 /37C 融化

[1297]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	50	22	0.96	5.27	1.0361	107.1
2	185	29	0.83	5.26	1.0422	163.0
3	180	38	0.88	5.27	1.0522	201.2
4	185	41	0.90	5.24	1.0535	198.9
5	180	44	0.92	5.28	1.0552	201.4
6	195	40	0.91	5.32	1.0558	201.7
7	180	40	0.91	5.32	1.0560	199.6
8	175	41	0.85	5.26	1.0568	206.2
9	190	48	0.91	5.3	1.0619	229.3

[1298] 表 76 :在含低离子型制剂中的新鲜融化 (23℃水浴) 的 247.5mg/ml 阿达木单抗的瓶子中的蛋白浓度、电导率、重量摩尔渗透压浓度、密度和 pH 分布

[1299] 冷冻和融化条件：-70C 顶部 /23C 融化

[1300]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	65	46	0.98	5.28	1.0755	260.9
2	190	72	0.97	5.28	1.0751	270.8
3	190	56	0.97	5.28	1.0751	314.7
4	200	49	0.96	5.27	1.0751	274.8
5	200	58	0.96	5.27	1.0752	278.4
6	210	57	0.97	5.28	1.0752	275.0
7	210	76	0.96	5.28	1.0748	276.5
8	175	75	0.96	5.27	1.0754	274.5
9	150	62	0.97	5.28	1.0763	276.3

[1301] 冷冻和融化条件：-70C 中间 /23C 融化

[1302]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	80	37	0.95	5.29	1.0671	250.0
2	200	59	0.95	5.32	1.0704	251.3
3	175	51	0.97	5.31	1.0722	262.7
4	215	56	0.98	5.31	1.073	327.1
5	200	48	0.99	5.31	1.0739	267.7
6	200	67	0.98	5.31	1.0744	270.6
7	230	59	0.95	5.32	1.0753	273.2
8	175	70	0.96	5.32	1.0771	273.3
9	175	83	0.96	5.32	1.0825	289.6

[1303] 冷冻和融化条件：-70C 底部 /23C 融化

[1304]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	50	32	0.92	5.24	1.0632	215.3
2	230	59	0.95	5.27	1.069	221.7
3	175	72	0.96	5.27	1.0708	268.1
4	180	58	0.96	5.27	1.0725	260.7
5	210	63	0.96	5.27	1.0729	266.8
6	150	69	0.96	5.28	1.0744	280.3
7	225	50	0.96	5.29	1.0762	280.3
8	200	68	0.95	5.28	1.0789	288.6
9	180	70	0.95	5.29	1.0846	293.0

[1305] 表 77：干冰冷冻后在含低离子型制剂中的新鲜融化（23℃水浴）的 247.5mg/ml 阿达木单抗的瓶子中的蛋白浓度、电导率、重量摩尔渗透压浓度、密度和 pH 分布

[1306] 冷冻和融化条件：干冰冷冻 /23C 融化

[1307]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	50	51	0.94	5.28	1.0643	258.9
2	210	68	0.94	5.29	1.0683	261.9
3	180	50	0.95	5.29	1.0702	251.7
4	190	69	0.95	5.29	1.0732	262.2
5	210	72	0.96	5.31	1.0738	274.4
6	225	63	0.95	5.3	1.0746	265.7
7	160	57	0.95	5.3	1.0747	261.9
8	190	63	0.95	5.31	1.0749	270.9
9	200	50	0.95	5.31	1.075	271.4

[1308] 冷冻和融化条件：干冰冷冻 /2-8C 融化

[1309]

样品名称	体积 ml	重量摩尔 渗透压浓度 mosm/kg	电导率 mS/cm	pH	密度 g/cm <sup>3</sup>	阿达木单抗浓度 mg/ml
1	50	44	0.96	5.29	1.0665	263.1
2	190	53	0.96	5.31	1.0684	258.1
3	200	56	0.96	5.30	1.0691	247.6
4	200	58	0.96	5.30	1.0693	262.2
5	190	64	0.95	5.31	1.0695	243.2
6	200	61	0.95	5.3	1.0695	266.8
7	175	49	0.96	5.32	1.0697	256.2
8	200	50	0.95	5.31	1.0697	261.2
9	175	48	0.96	5.32	1.0704	247.1

[1310] 附录 A :PCS 数据

[1311] 阿达木单抗

[1312]

浓度 [mg/mL]	浓度 [mg/mL] 平均值	z-平均值 [nm]	z-平均值的 平均值 [nm]	峰单体 [nm]	峰单体 平均值 [nm]
9,35	9,35	2,08	2,08	2,55	2,55
23,40	23,27	2,30	2,47	2,81	2,87
22,70		2,77		3,01	
23,70		2,36		2,78	
34,80	34,20	1,56	1,55	1,85	1,87
35,70		1,54		1,82	
32,10		1,56		1,93	
35,40	36,10	1,61	1,63	1,92	1,92
36,10		1,64		1,93	
36,80		1,63		1,92	
42,10	43,00	1,75	1,75	2,12	2,12
45,60		1,78		2,15	
41,30		1,74		2,10	
60,20	57,40	2,06	2,02	2,27	2,37
55,90		2,04		2,45	
56,10		1,98		2,39	
63,20	65,87	2,11	2,24	2,52	2,67
71,70		2,49		2,89	
62,70		2,13		2,61	
73,40	75,13	2,38	2,41	2,83	2,89
75,60		2,51		3,01	
76,40		2,35		2,82	
78,60	78,07	2,53	2,55	2,99	2,99
78,80		2,62		3,01	
76,80		2,50		2,96	
90,40	95,73	2,80	2,85	3,35	3,41
107,40		2,99		3,55	
89,40		2,76		3,33	
96,20	94,77	2,88	2,86	3,50	3,50
96,00		2,91		3,61	
92,10		2,80		3,38	
201,00	206,63	4,52	4,82	5,22	5,74
227,50		5,04		6,12	
191,40		4,89		5,89	

[1313] J695

[1314]

浓度 [mg/mL]	浓度 [mg/mL] 平均值	z-平均值 [nm]	z-平均值的 平均值[nm]	峰单体 [nm]	峰单体 平均值[nm]
9,99	9,99	2,28	2,28	1,66	1,66
19,31	19,29	2,05	2,12	1,81	1,81
19,26		2,30		1,79	
19,29		2,02		1,84	
29,59	29,40	1,78	1,62	1,10	1,16
29,7		1,51		1,15	
28,91		1,56		1,22	
37,97	37,55	1,51	1,56	1,22	1,23
38,02		1,67		1,22	
36,65		1,49		1,24	
49,15	46,32	1,64	1,58	1,31	1,29
45,95		1,57		1,30	
43,87		1,53		1,26	
58,75	56,18	1,60	1,61	1,49	1,47
55,02		1,71		1,38	
54,76		1,53		1,53	
77,69	77,81	2,64	2,43	2,73	2,61
77,62		2,31		2,57	
78,13		2,35		2,52	
94,45	97,65	2,11	2,07	2,05	2,05
105,06		2,14		2,05	
93,45		1,97		2,04	
116,37	114,52	3,69	2,69	1,95	2,00
113,92		2,25		2,06	
113,27		2,13		1,99	
121,21	133,25	9,78	9,49	11,50	11,00
139,8		9,63		11,10	
138,73		9,06		10,40	
226,67	217,53	4,94	5,34	4,72	4,84
216,1		6,01		5,25	
209,83		5,06		4,55	

[1315] 人血清白蛋白

[1316]

浓度 [mg/mL]	浓度 [mg/mL] 平均值	z-平均值 [nm]	z-平均值的 平均值[nm]	峰单体 [nm]	峰单体 平均值[nm]
9,88	9,88	14,90	14,90	2,32	2,32
22,94	22,89	8,26	8,29	1,2	1,18
22,73		8,28		1,18	
23,00		8,33		1,17	
36,78	36,47	7,40	7,44	1,22	1,23
37,33		7,80		1,24	
35,29		7,12		1,22	
45,97	46,06	7,09	6,92	1,27	1,25
47,61		6,54		1,24	
44,61		7,13		1,25	
58,47	58,56	5,94	6,13	1,3	1,31
62,69		6,04		1,31	
54,52		6,41		1,32	
61,89	60,31	5,83	6,14	1,33	1,32
59,76		6,57		1,34	
59,28		6,01		1,29	
75,37	76,24	5,58	5,46	1,4	1,40
83,69		5,14		1,45	
69,67		5,67		1,36	
92,90	85,87	5,30	5,14	1,49	1,47
84,22		5,05		1,49	
80,50		5,08		1,43	
115,93	112,74	4,78	4,94	1,68	1,61
110,00		5,04		1,58	
112,30		4,99		1,57	
182,79	177,69	9,85	9,13	2,27	2,19
178,24		9,29		2,21	
172,05		8,26		2,08	

[1317] 附录 B :SEC 数据

[1318] 阿达木单抗

[1319]

浓度 [mg/mL]	平均浓度 [mg/mL]	单体 [%]	平均单体 [%]	聚集体 [%]	平均聚集体 [%]	片段 [%]	平均片段 [%]
9,35	9,35	99,40	99,40	0,50	0,50	0,10	0,10
23,40	23,27	99,60	99,57	0,40	0,40	0,10	0,10
22,70		99,50		0,40		0,10	
23,70		99,60		0,40		0,10	
34,80	34,20	99,50	99,47	0,50	0,47	0,10	0,10
35,70		99,40		0,50		0,10	
32,10		99,50		0,40		0,10	
35,40	36,10	99,40	99,40	0,60	0,53	0,10	0,10
36,10		99,40		0,50		0,10	
36,80		99,40		0,50		0,10	
42,10	43,00	99,40	99,33	0,50	0,57	0,10	0,10
45,60		99,30		0,60		0,10	
41,30		99,30		0,60		0,10	
60,20	57,40	99,30	99,30	0,60	0,60	0,10	0,10
55,90		99,30		0,60		0,10	
56,10		99,30		0,60		0,10	
63,20	65,87	99,30	99,27	0,60	0,67	0,10	0,10
71,70		99,20		0,70		0,10	
62,70		99,30		0,70		0,10	
73,40	75,13	99,20	99,23	0,70	0,70	0,10	0,10
75,60		99,20		0,70		0,10	
76,40		99,30		0,70		0,10	
78,60	78,07	99,30	99,30	0,60	0,60	0,10	0,10
78,80		99,30		0,60		0,10	
76,80		99,30		0,60		0,10	
90,40	95,73	99,20	99,13	0,80	0,80	0,10	0,10
107,40		99,10		0,80		0,10	
89,40		99,10		0,80		0,10	
96,20	94,77	99,10	99,03	0,80	0,87	0,10	0,10
96,00		99,00		0,90		0,10	
92,10		99,00		0,90		0,10	
201,00	206,63	98,80	98,80	1,10	1,10	0,10	0,10
227,50		98,80		1,10		0,10	
191,40		98,80		1,10		0,10	

[1320] J695

[1321]

浓度 [mg/mL]	平均浓度 [mg/mL]	单体 [%]	平均单体 [%]	聚集体 [%]	平均聚集体 [%]	片段 [%]	平均片段 [%]
9,99	9,99	99,39	99,39	0,44	0,44	0,17	0,17
19,31	19,29	99,38	99,38	0,44	0,44	0,18	0,19
19,26		99,37		0,44		0,20	
19,29		99,38		0,44		0,18	
29,59	29,40	99,31	99,33	0,51	0,50	0,18	0,18
29,70		99,32		0,50		0,18	
28,91		99,35		0,48		0,17	
37,97	37,55	99,31	99,29	0,52	0,52	0,17	0,19
38,02		99,27		0,52		0,21	
36,65		99,30		0,51		0,19	
49,15	46,32	99,19	99,20	0,60	0,60	0,21	0,20
45,95		99,20		0,60		0,20	
43,87		99,20		0,61		0,19	
58,75	56,18	99,16	99,16	0,64	0,64	0,21	0,21
55,02		99,17		0,64		0,20	
54,76		99,15		0,63		0,22	
77,69	77,81	99,11	99,10	0,70	0,70	0,19	0,20
77,62		99,09		0,69		0,22	
78,13		99,10		0,70		0,20	
94,45	97,65	99,05	99,06	0,72	0,71	0,23	0,22
105,06		99,06		0,72		0,21	
93,45		99,07		0,70		0,23	
116,37	114,52	98,94	98,91	0,85	0,88	0,21	0,22
113,92		98,91		0,88		0,22	
113,27		98,89		0,90		0,22	
121,21	133,25	98,87	98,89	0,91	0,90	0,22	0,22
139,80		98,89		0,89		0,22	
138,73		98,90		0,89		0,21	
226,67	217,53	98,58	98,57	1,19	1,21	0,24	0,23
216,10		98,58		1,18		0,24	
209,83		98,54		1,25		0,21	

[1322] 人血清白蛋白

[1323]

样品	峰1		峰2		峰3		峰4 (HSA)	
	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]
样品1 c= 9,88 mg/ml	59,710	2,312	2,975	0,115	43,159	1,671	2477,282	95,902
样品2 c= 22,94 mg/ml	102,785	2,685	7,859	0,205	73,588	1,923	3643,350	95,187
样品3 c= 22,73 mg/ml	124,226	3,071	11,038	0,273	83,310	2,059	3826,908	94,597
样品4 c= 23,00 mg/ml	138,353	3,266	14,525	0,343	88,429	2,087	3994,990	94,304
样品5 c= 36,78 mg/ml	147,465	3,459	14,537	0,341	91,304	2,141	4010,385	94,059
样品6 c= 37,33 mg/ml	153,956	3,552	14,707	0,339	94,093	2,171	4071,680	93,938
样品7 c= 35,29 mg/ml	171,478	3,608	16,064	0,338	105,244	2,214	4459,830	93,839
样品8 c= 45,97 mg/ml	180,027	3,675	17,392	0,355	109,717	2,239	4592,102	93,731
样品9 c= 47,61 mg/ml	193,325	3,719	19,206	0,370	116,474	2,241	4868,705	93,670
样品10 c= 44,61 mg/ml	191,512	3,799	19,167	0,380	112,261	2,227	4718,554	93,594
样品11 c= 58,47 mg/ml	215,044	4,026	17,870	0,335	118,481	2,218	4989,978	93,421
样品12 c= 62,69 mg/ml	218,072	4,037	20,088	0,372	122,251	2,263	5041,542	93,328
样品13 c= 54,52 mg/ml	228,014	4,053	19,957	0,355	126,583	2,250	5251,513	93,343
样品14 c= 61,89 mg/ml	231,235	4,085	22,518	0,398	127,330	2,250	5279,038	93,267
样品15 c= 59,76 mg/ml	237,894	4,100	22,939	0,395	130,352	2,246	5411,384	93,258
样品16 c= 59,28 mg/ml	202,103	4,139	17,178	0,352	108,780	2,228	4554,912	93,282
样品17 c= 75,37 mg/ml	230,552	4,196	18,565	0,338	123,207	2,242	5122,467	93,224
样品18 c= 83,69 mg/ml	215,365	4,162	18,136	0,351	110,152	2,129	4830,372	93,358

[1324]

样品	峰1		峰2		峰3		峰4 (HSA)	
	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]	区域 [mVs]	区域 [%]
样品21 c= 84,22 mg/ml	233,866	4,316	21,951	0,405	116,325	2,147	5046,183	93,132
样品22 c= 80,50 mg/ml	221,816	4,461	18,940	0,381	111,006	2,232	4620,655	92,926
样品23 c= 115,93 mg/ml	223,187	4,783	16,684	0,358	104,116	2,231	4322,732	92,629
样品24 c= 110,00 mg/ml	209,281	4,718	18,745	0,423	96,430	2,174	4111,363	92,686
样品25 c= 112,30 mg/ml	172,657	4,537	15,457	0,406	80,850	2,125	3536,192	92,932
样品26 c= 182,79 mg/ml	178,208	4,950	15,254	0,424	80,906	2,247	3325,648	92,379
样品27 c= 178,24 mg/ml	194,516	4,814	17,323	0,429	90,433	2,238	3738,717	95,520
样品28 c= 172,05 mg/ml	79,605	2,103	12,876	0,340	74,965	1,981	3617,238	95,576

[1325] 附录 C : IEC 数据

[1326] 阿达木单抗

[1327]

浓度 [mg/mL]	平均浓度 [mg/mL]	赖氨酸总和 [%]	平均总和 [%]
9,35	9,35	86,09	86,09
23,40	23,27	86,15	86,13
22,70		86,12	
23,70		86,13	
34,80	34,20	86,15	86,11
35,70		86,11	
32,10		86,06	
35,40	36,10	86,03	86,04
36,10		86,06	
36,80		86,03	
42,10	43,00	85,98	85,96
45,60		85,95	
41,30		85,95	
60,20	57,40	85,97	85,96
55,90		85,94	
56,10		85,97	
63,20	65,87	85,96	85,94
71,70		85,97	
62,70		85,90	
73,40	75,13	85,99	85,97
75,60		85,98	
76,40		85,95	
78,60	78,07	86,00	85,97
78,80		85,97	
76,80		85,94	
90,40	95,73	85,96	85,92
107,40		85,97	
89,40		85,83	
96,20	94,77	85,93	85,88
96,00		85,87	
92,10		85,84	
201,00	206,63	85,88	85,90
227,50		85,97	
191,40		85,84	

[1328] J695

[1329]

浓度 [mg/mL]	平均浓度 [mg/mL]	峰1-7总和 [%]	平均峰1-7总和 [%]	酸性峰总和 [%]	平均酸性峰总和 [%]	碱性峰总和 [%]	平均碱性峰总和 [%]
9,99	9,99	89,24	89,24	10,24	10,24	0,52	0,52
19,31	19,29	89,32	89,28	10,19	10,21	0,50	0,51
19,26		89,23		10,26		0,52	
19,29		89,30		10,19		0,51	
29,59	29,40	89,33	89,30	10,14	10,17	0,54	0,53
29,70		89,26		10,20		0,54	
28,91		89,32		10,16		0,52	
37,97	37,55	89,32	89,30	10,13	10,15	0,56	0,55
38,02		89,27		10,18		0,55	
36,65		89,31		10,15		0,55	
49,15	46,32	89,07	89,10	10,40	10,37	0,53	0,53
45,95		89,12		10,34		0,54	
43,87		89,12		10,36		0,53	
58,75	56,18	89,13	89,17	10,36	10,31	0,52	0,53
55,02		89,21		10,27		0,52	
54,76		89,18		10,29		0,54	
77,69	77,81	89,22	89,17	10,25	10,29	0,53	0,54
77,62		89,09		10,36		0,55	
78,13		89,20		10,26		0,55	
94,45	97,65	89,20	89,16	10,28	10,30	0,52	0,54
105,06		89,12		10,33		0,55	
93,45		89,16		10,29		0,55	
116,37	114,52	89,03	89,08	10,41	10,36	0,56	0,55
113,92		89,15		10,31		0,54	
113,27		89,06		10,37		0,56	
121,21	133,25	89,26	89,13	10,20	10,33	0,54	0,55
139,80		89,07		10,38		0,56	
138,73		89,05		10,40		0,55	
226,67	217,53	88,72	88,78	10,69	10,63	0,59	0,59
216,10		88,82		10,60		0,58	
209,83		88,81		10,60		0,59	

[1330] 附录 D

[1331]

实验项目	组分	实验持续时间	63 mg/mL	220 mg/mL
			5°C	5°C
澄清度和乳色	浊度	起始	3,6	8,0
		1个月	3,5	8,0
		3个月	3,5	7,4
液体显色程度	B级	起始	< B9	=B9
		1个月	< B9	< B8
		3个月	< B9	< B7
pH	单值	起始	5,3	5,4
		1个月	5,3	5,4
		3个月	5,3	5,4
颗粒污染: 肉眼可见颗粒	目检评分	起始	2,2	0,2
		1个月	2,2	0,4
		3个月	2,1	0,2
颗粒污染: 在显微镜下 才能看得见的 颗粒	颗粒 $\geq 10$ $\mu\text{m}$ [ 容器 ]	起始	181	357
		1个月	423	290
		3个月	216	1762
	颗粒 $\geq 25$ $\mu\text{m}$ [ 容器 ]	起始	15	3
		1个月	11	18
		3个月	2	50
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	起始	0,2	0,5
		1个月	0,2	0,6
		3个月	0,2	0,7
	主峰 (单体) [%]	起始	99,8	99,4
		1个月	99,7	99,3
		3个月	99,7	99,2
	主峰 (片段) [%]	起始	0,1	0,1
		1个月	0,1	0,1
		3个月	0,0	0,0
阳离子交换 HPLC (CEX- HPLC)	第一酸性区域 [%]	起始	2,2	2,2
		1个月	2,2	2,2
		3个月	2,1	2,0
	第二酸性区域 [%]	起始	10,4	10,3
		1个月	10,2	10,0
		3个月	10,4	10,2
	赖氨酸变体总和 [%]	起始	86,0	86,1
		1个月	85,9	85,9
		3个月	86,2	86,1
	赖氨酸1和 赖氨酸2之间 的峰 [%]	起始	0,8	0,8
		1个月	1,0	1,0
		3个月	0,8	0,8
赖氨酸2之后 的峰 [%]	起始	0,5	0,6	
	1个月	0,7	0,9	
	3个月	0,5	0,8	

[1332]

实验项目	组分	实验持续时间	63 mg/mL	220 mg/mL
			25°C/60% R.H.	25°C/60% R.H.
澄清度和乳色	浊度	起始	-	-
		1个月	3,51	8,55
		3个月	3,70	7,56
液体显色程度	B级	起始	-	-
		1个月	< B9	< B8
		3个月	< B9	< B7
pH	单值	起始	-	-
		1个月	5,4	5,4
		3个月	5,3	5,4
颗粒污染: 肉眼可见颗粒	目检评分	起始	-	-
		1个月	2,5	0,7
		3个月	3,4	0,0
颗粒污染: 在显微镜下 才能看得见的 颗粒	颗粒 $\geq 10$ $\mu\text{m}$ [ / 容器 ]	起始	-	-
		1个月	412	490
		3个月	277	4516
	颗粒 $\geq 25$ $\mu\text{m}$ [ / 容器 ]	起始	-	-
		1个月	10	14
		3个月	7	128
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	起始	-	-
		1个月	0,3	0,8
		3个月	0,4	1,1
	主峰 (单体) [%]	起始	-	-
		1个月	99,6	99,0
		3个月	99,4	98,6
	主峰 (片段) [%]	起始	-	-
		1个月	0,2	0,2
		3个月	0,2	0,2
阳离子交换 HPLC (CEX- HPLC)	第一酸性区域 [%]	起始	-	-
		1个月	2,5	2,4
		3个月	3,4	3,2
	第二酸性区域 [%]	起始	-	-
		1个月	11,7	11,4
		3个月	15,3	14,9
	赖氨酸变体总和 [%]	起始	-	-
		1个月	83,6	83,8
		3个月	79,2	79,2
	赖氨酸1和 赖氨酸2之间 的峰 [%]	起始	-	-
		1个月	1,2	1,3
		3个月	1,3	1,3
赖氨酸2 之后的峰 [%]	起始	-	-	
	1个月	0,9	1,1	
	3个月	0,8	1,4	

[1333]

实验项目	组分	实验持续时间	63 mg/mL	220 mg/mL
			40°C/75% R.H.	40°C/75% R.H.
澄清度和乳色	浊度	起始	-	-
		1个月	3,93	7,80
		3个月	3,70	8,10
液体显色程度	B级	起始	-	-
		1个月	=B9	=B8
		3个月	< B8	< B7
pH	单值	起始	-	-
		1个月	5,3	5,4
		3个月	5,3	5,4
颗粒污染: 肉眼可见颗粒	目检评分	起始	-	-
		1个月	6,7	0,5
		3个月	17,5	0,4
颗粒污染: 在显微镜下 才能看得见的 颗粒	颗粒 $\geq 10$ $\mu\text{m}$ [ / 容器 ]	起始	-	-
		1个月	1088	518
		3个月	166	612
	颗粒 $\geq 25$ $\mu\text{m}$ [ / 容器 ]	起始	-	-
		1个月	16	14
		3个月	11	30
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	起始	-	-
		1个月	0,4	1,4
		3个月	0,8	2,5
	主峰 (单体) [%]	起始	-	-
		1个月	99,0	98,0
		3个月	97,8	96,0
	主峰 (片段) [%]	起始	-	-
		1个月	0,6	0,6
		3个月	1,4	1,5
阳离子交换 HPLC (CEX- HPLC)	第一酸性区域 [%]	起始	-	-
		1个月	6,7	6,8
		3个月	17,5	17,4
	第二酸性区域 [%]	起始	-	-
		1个月	25,1	23,6
		3个月	40,9	38,6
	赖氨酸变体总和 [%]	起始	-	-
		1个月	64,5	62,0
		3个月	36,0	36,0
	赖氨酸1和 赖氨酸2之间 的峰 [%]	起始	-	-
		1个月	2,2	2,5
		3个月	2,9	3,1
赖氨酸2 之后的峰 [%]	起始	-	-	
	1个月	1,5	5,2	
	3个月	1,7	4,8	

[1334]

附录E

2-8°C

实验项目	组分	实验持续时间	澄清且无色															
			LI 50 01 <sup>2</sup>	LI 50 02 <sup>2</sup>	LI 50 03 <sup>2</sup>	LI 50 04 <sup>2</sup>	LI 50 05 <sup>2</sup>	LI 50 06 <sup>2</sup>	LI 50 07 <sup>2</sup>	LI 50 08 <sup>2</sup>	LI 200 01 <sup>2</sup>	LI 200 02 <sup>2</sup>	LI 200 03 <sup>2</sup>	LI 200 04 <sup>2</sup>	LI 200 05 <sup>2</sup>	LI 200 06 <sup>2</sup>	LI 200 07 <sup>2</sup>	LI 200 08 <sup>2</sup>
澄清度和乳色	吸光度 (340 nm)	起始	0,096	0,096	0,095	0,100	0,104	0,105	0,099	0,107	0,181	0,181	0,182	0,192	0,184	0,197	0,191	0,199
		1个月	0,102	0,102	0,093	0,094	0,099	0,101	0,097	0,100	0,181	0,185	0,189	0,181	0,190	0,180	0,192	0,192
显色程度	目检	起始	澄清且无色															
pH	单值	1个月	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,6	5,6	5,6	5,5	5,6	5,5
		1个月	5,4	5,5	5,4	5,5	5,4	5,5	5,4	5,5	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6	5,5	5,6	5,5
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	起始	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
		1个月	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,7	0,2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	主峰 (单体) [%]	起始	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3
		1个月	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,2	99,2
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	主峰 (片段) [%]	起始	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
		1个月	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	第一酸性区域 [%]	起始	3,8	3,7	3,7	3,7	3,7	3,9	3,8	3,8	3,8	3,7	3,8	3,6	4,5	3,9	2,7	2,8
		1个月	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,5	3,5	3,5	3,5
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	第二酸性区域 [%]	起始	10,9	10,7	10,4	10,5	10,4	10,1	10,3	10,2	10,4	10,2	10,4	10,2	9,8	10,1	9,5	11,6
		1个月	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,2	9,3	9,1	9,0	9,1	9,0	9,1	9,0	9,1
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	精氨酸变体总和 [%]	起始	83,8	84,2	84,4	84,3	84,4	84,6	84,4	84,6	84,4	84,6	84,4	84,6	85,2	83,9	85,2	84,3
		1个月	86,0	86,0	86,0	86,0	86,0	85,9	86,1	86,0	86,3	86,1	86,1	86,2	86,0	86,0	86,1	86,1
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	精氨酸1和精氨酸2之间的峰 [%]	起始	0,9	8,3	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
		1个月	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	0,6
阳离子交换 HPLC (CEX-HPLC)	精氨酸2之后的峰 [%]	起始	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
		1个月	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8

[1335]

25°C

实验项目	组分	实验持续时间	LI 50 01 <sup>2</sup>	LI 50 02 <sup>2</sup>	LI 50 03 <sup>2</sup>	LI 50 04 <sup>2</sup>	LI 50 05 <sup>2</sup>	LI 50 06 <sup>2</sup>	LI 50 07 <sup>2</sup>	LI 50 08 <sup>2</sup>	LI 200 01 <sup>2</sup>	LI 200 02 <sup>2</sup>	LI 200 03 <sup>2</sup>	LI 200 04 <sup>2</sup>	LI 200 05 <sup>2</sup>	LI 200 06 <sup>2</sup>	LI 200 07 <sup>2</sup>	LI 200 08 <sup>2</sup>
澄清度和乳色	吸光度 (340 nm)	起始	0.096	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.192	0.184	0.197	0.191	0.199
显色程度	目检	1个月	0.106	0.109	0.096	0.099	0.104	0.104	0.096	0.105	0.178	0.177	0.198	0.189	0.200	0.194	0.194	0.172
		1个月	澄清且无色															
pH	单值	起始	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.5	5.6	5.5
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	1个月	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
	主峰 (单体) [%]	起始	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
	主峰 (片段) [%]	1个月	0.2	0.2	0.2	0.2	?	?	?	0.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
阳离子交换 (CEX-HPLC)	主峰 (片段) [%]	1个月	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.7	99.5	99.0	99.0	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
	第一酸性区域 [%]	起始	99.6	99.6	99.6	99.6	?	?	?	99.5	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.9	98.9
	第二酸性区域 [%]	1个月	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
赖氨酸变体总和	第一酸性区域 [%]	1个月	0.2	0.2	0.2	0.2	?	?	?	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	第二酸性区域 [%]	起始	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.8
	赖氨酸变体总和 [%]	1个月	4.1	4.2	4.1	4.1	4.2	4.2	4.1	4.2	4.0	4.0	4.1	4.1	4.0	4.1	4.1	4.0
赖氨酸1和赖氨酸2之间的峰 [%]	第一酸性区域 [%]	起始	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3
	第二酸性区域 [%]	1个月	10.9	10.9	11.0	10.9	11.0	11.0	11.0	11.0	11.1	10.6	10.7	10.7	10.7	10.7	10.7	10.9
	赖氨酸变体总和 [%]	起始	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.4	84.6	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5
赖氨酸2之后的峰 [%]	第一酸性区域 [%]	1个月	83.3	83.4	83.3	83.3	83.2	83.2	83.3	83.1	83.4	83.6	83.4	83.6	83.6	83.5	83.3	83.4
	第二酸性区域 [%]	起始	0.9	8.3	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	赖氨酸2之后的峰 [%]	1个月	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.0	0.8	0.8	0.7	0.7	0.8	0.9	0.8
赖氨酸2之后的峰 [%]	第一酸性区域 [%]	起始	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
	第二酸性区域 [%]	1个月	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

[1336]

40°C

实验项目	组分	实验持续时间	澄清且无色																
			Li 50 01 <sup>h</sup>	Li 50 02 <sup>h</sup>	Li 50 03 <sup>h</sup>	Li 50 04 <sup>h</sup>	Li 50 05 <sup>h</sup>	Li 50 06 <sup>h</sup>	Li 50 07 <sup>h</sup>	Li 50 08 <sup>h</sup>	Li 200 01 <sup>h</sup>	Li 200 02 <sup>h</sup>	Li 200 03 <sup>h</sup>	Li 200 04 <sup>h</sup>	Li 200 05 <sup>h</sup>	Li 200 06 <sup>h</sup>	Li 200 07 <sup>h</sup>	Li 200 08 <sup>h</sup>	
澄清度和乳色	吸光度 (340 nm)	起始 1个月	0.086	0.096	0.095	0.100	0.104	0.105	0.105	0.099	0.107	0.181	0.187	0.182	0.192	0.184	0.197	0.191	0.199
显色程度	目检	起始 1个月	0.100	0.110	0.099	0.101	0.111	0.116	0.105	0.113	0.204	0.202	0.198	0.205	0.199	0.216	0.209	0.224	0.224
pH	单值	起始 1个月	5.40	5.41	5.41	5.40	5.40	5.40	5.41	5.41	5.41	5.57	5.56	5.55	5.56	5.55	5.54	5.55	5.52
尺寸排阻色谱 (SE-HPLC)	主峰 (聚集体) [%]	起始 1个月	5.42	5.43	5.43	5.43	5.44	5.43	5.44	5.44	5.44	5.54	5.55	5.55	5.55	5.55	5.55	5.53	5.54
	主峰 (片段) [%]	起始 1个月	0.106	0.104	0.119	0.136	0.139	0.145	0.158	0.159	0.489	0.509	0.491	0.484	0.492	0.488	0.515	0.515	0.575
	主峰 (单体) [%]	起始 1个月	0.324	0.336	0.322	0.334	0.347	0.349	0.411	0.444	1.308	1.343	1.331	1.340	1.341	1.374	1.453	1.521	1.521
	主峰 (片段) [%]	起始 1个月	99.605	99.629	99.632	99.626	99.619	99.626	99.653	99.653	99.294	99.296	99.348	99.333	99.313	99.349	99.320	99.290	99.290
	第一酸性区域 [%]	起始 1个月	99.924	98.914	98.931	98.914	98.895	98.894	98.845	98.845	98.782	97.920	97.876	97.882	97.901	97.898	97.861	97.752	97.701
	第二酸性区域 [%]	起始 1个月	0.289	0.267	0.249	0.238	0.242	0.229	0.189	0.186	0.218	0.196	0.161	0.183	0.195	0.163	0.165	0.135	0.135
	赖氨酸变体总和 [%]	起始 1个月	0.752	0.751	0.747	0.752	0.758	0.757	0.744	0.773	0.773	0.781	0.777	0.759	0.762	0.765	0.794	0.779	0.779
	第一酸性区域 [%]	起始 1个月	3.8	3.7	3.7	3.7	3.7	3.9	3.8	3.8	3.7	3.8	3.6	4.5	3.9	2.7	2.7	2.8	2.8
	第二酸性区域 [%]	起始 1个月	5.4	5.8	5.3	5.8	5.4	5.8	5.4	5.5	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.6	5.3	5.4	5.4
	赖氨酸变体总和 [%]	起始 1个月	10.9	10.7	10.4	10.5	10.4	10.1	10.3	10.2	10.4	10.2	9.8	10.1	9.5	11.6	11.5	11.3	11.3
	赖氨酸1和赖氨酸2之间的峰 [%]	起始 1个月	29.8	29.8	29.7	29.7	29.8	29.8	30.2	30.7	28.6	28.9	28.5	28.7	28.6	28.9	29.1	29.2	29.2
	赖氨酸2之后的峰 [%]	起始 1个月	83.8	84.2	84.4	84.3	84.4	84.6	84.4	84.6	84.4	84.6	85.2	83.9	85.2	84.4	84.3	84.5	84.5
		起始 1个月	61.2	61.0	61.3	61.0	61.2	60.9	60.9	60.5	62.0	61.7	62.0	61.8	62.0	61.6	61.5	61.4	61.4
		起始 1个月	0.9	8.3	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
		起始 1个月	2.3	2.1	2.3	2.2	2.2	2.2	2.1	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.2	2.0	2.0	2.0	2.0
		起始 1个月	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.6
		起始 1个月	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.4	1.4	1.4	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	2.0	2.0	2.0

[1337] 等同方案

[1338] 本领域技术人员会认识到,或仅使用常规实验能确定,本文所述的本发明的特定实施方案的许多等同方案。这样的等同方案意在被下述权利要求所包括。在本申请中引用

---

的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容,都通过援引并入本文。

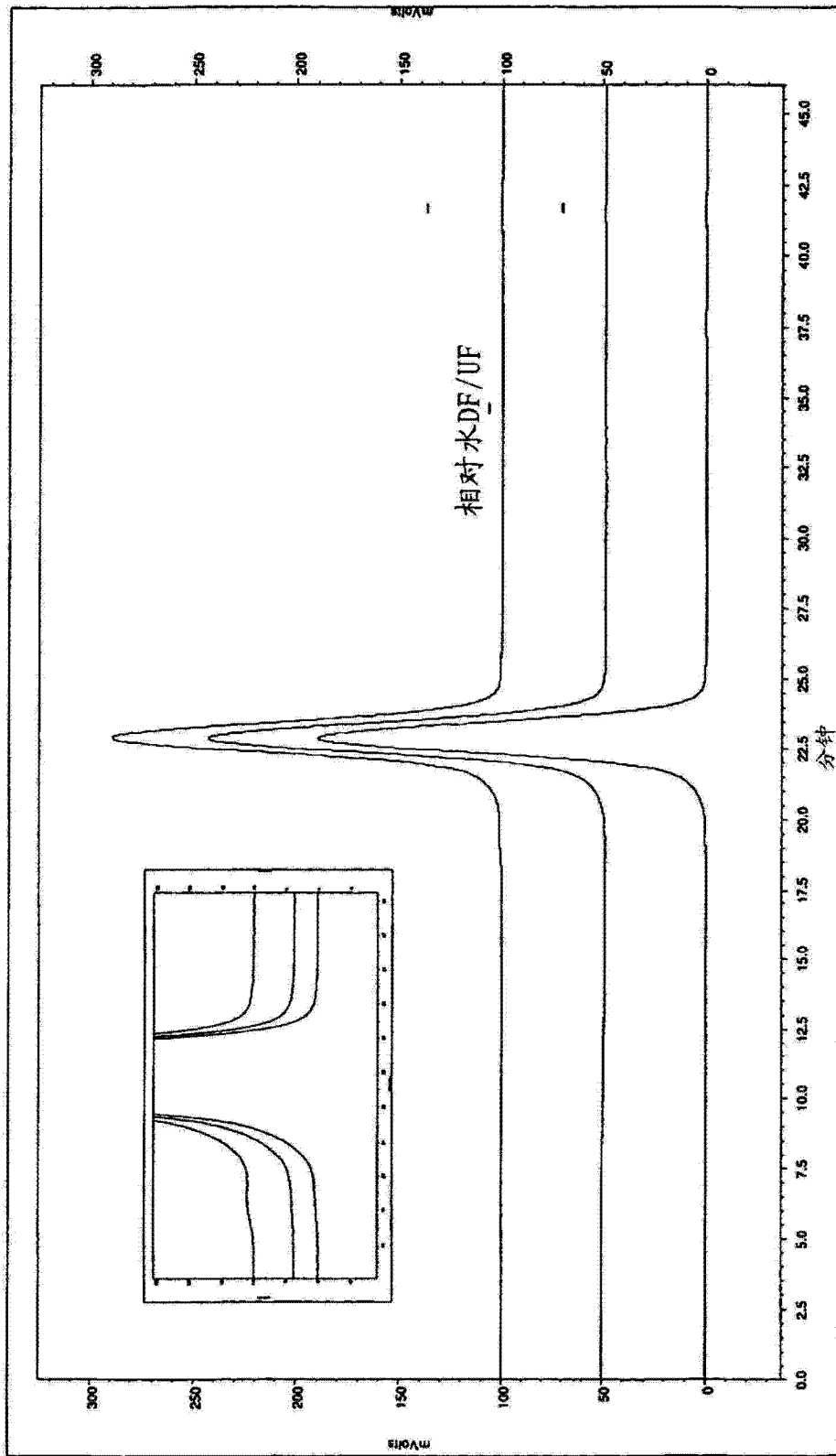


图 1

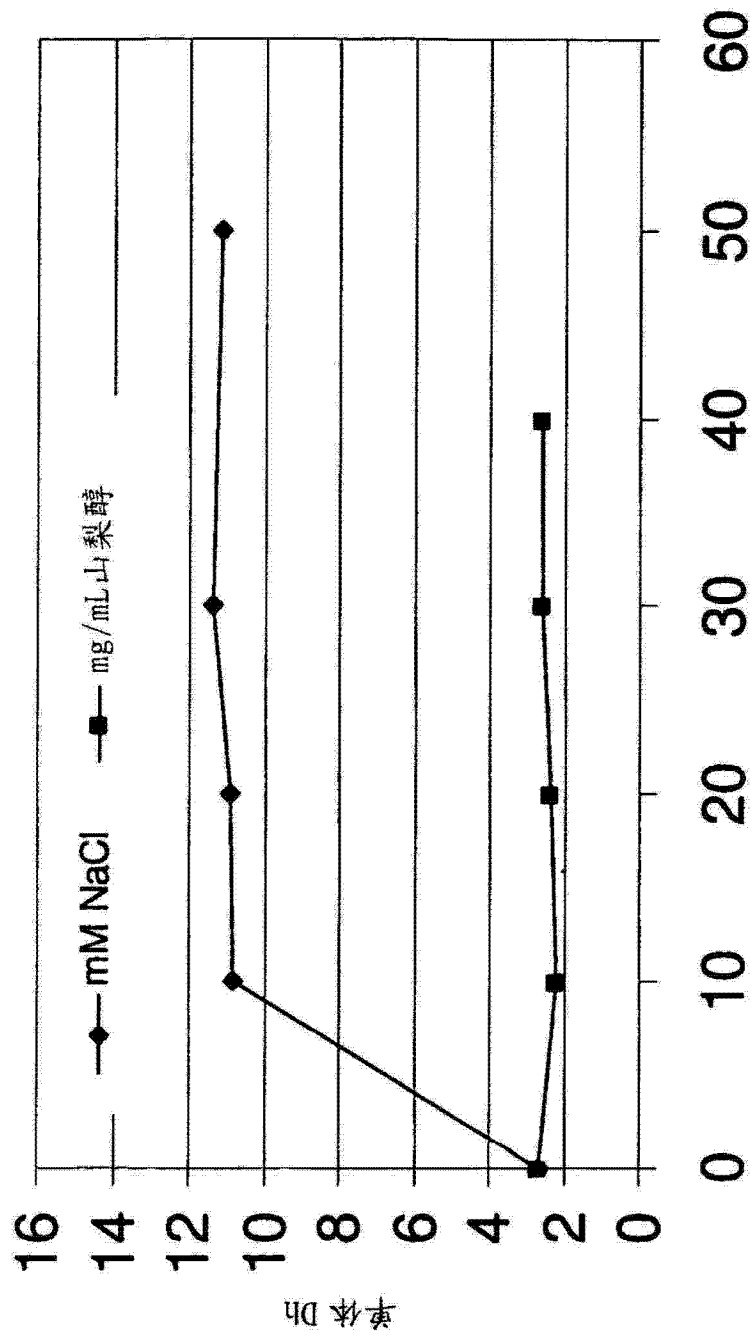


图 2

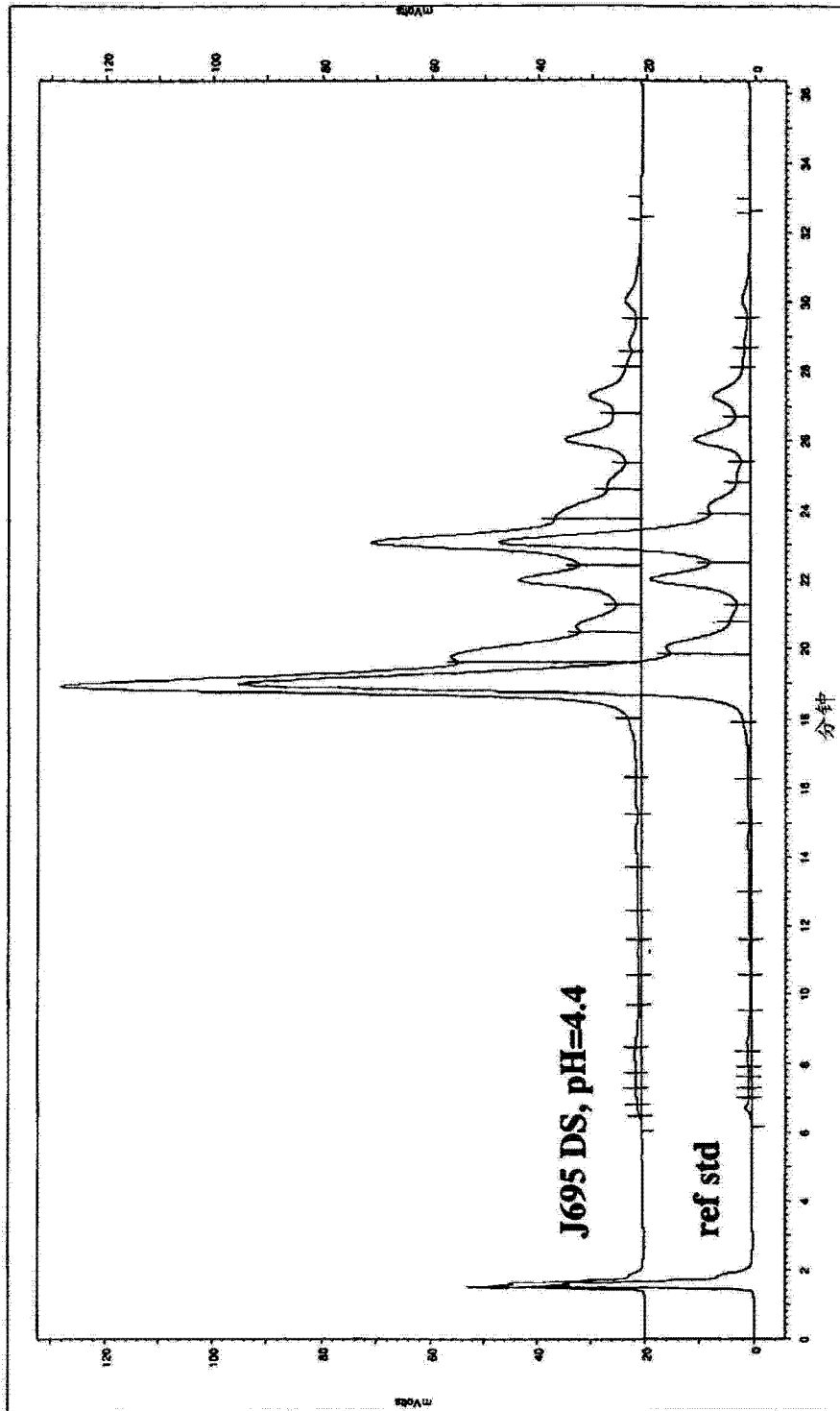


图 3

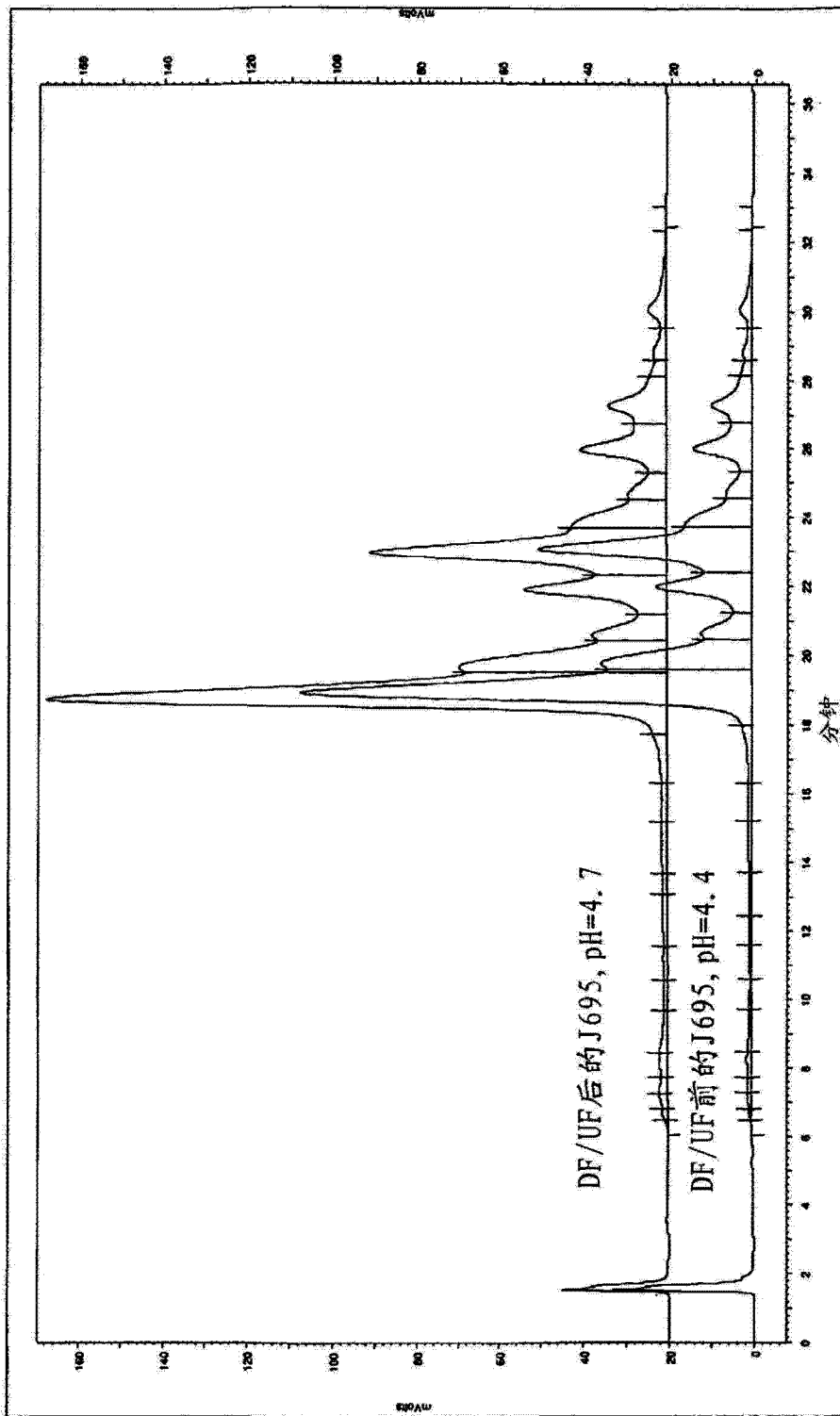


图 4

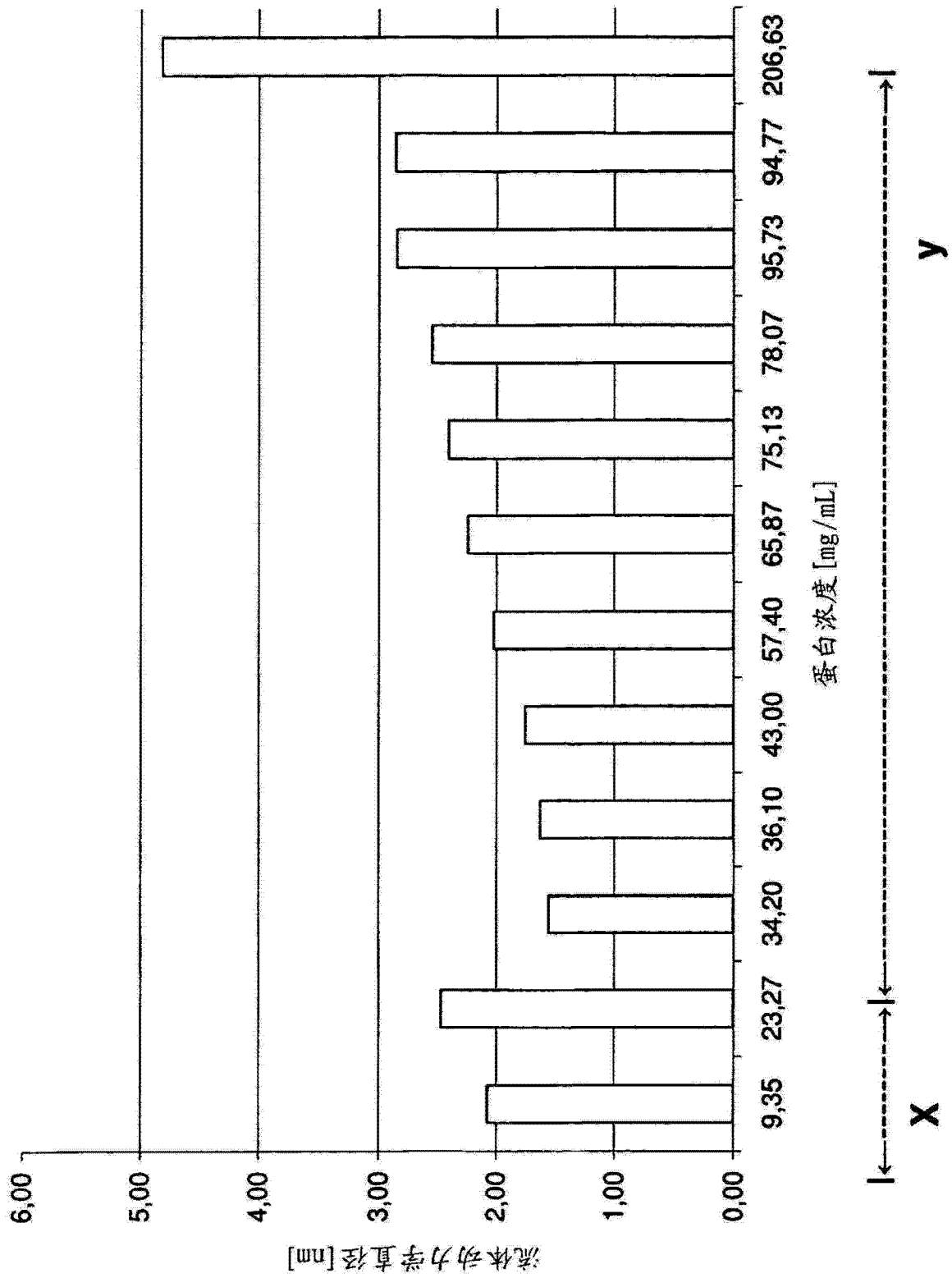


图 5

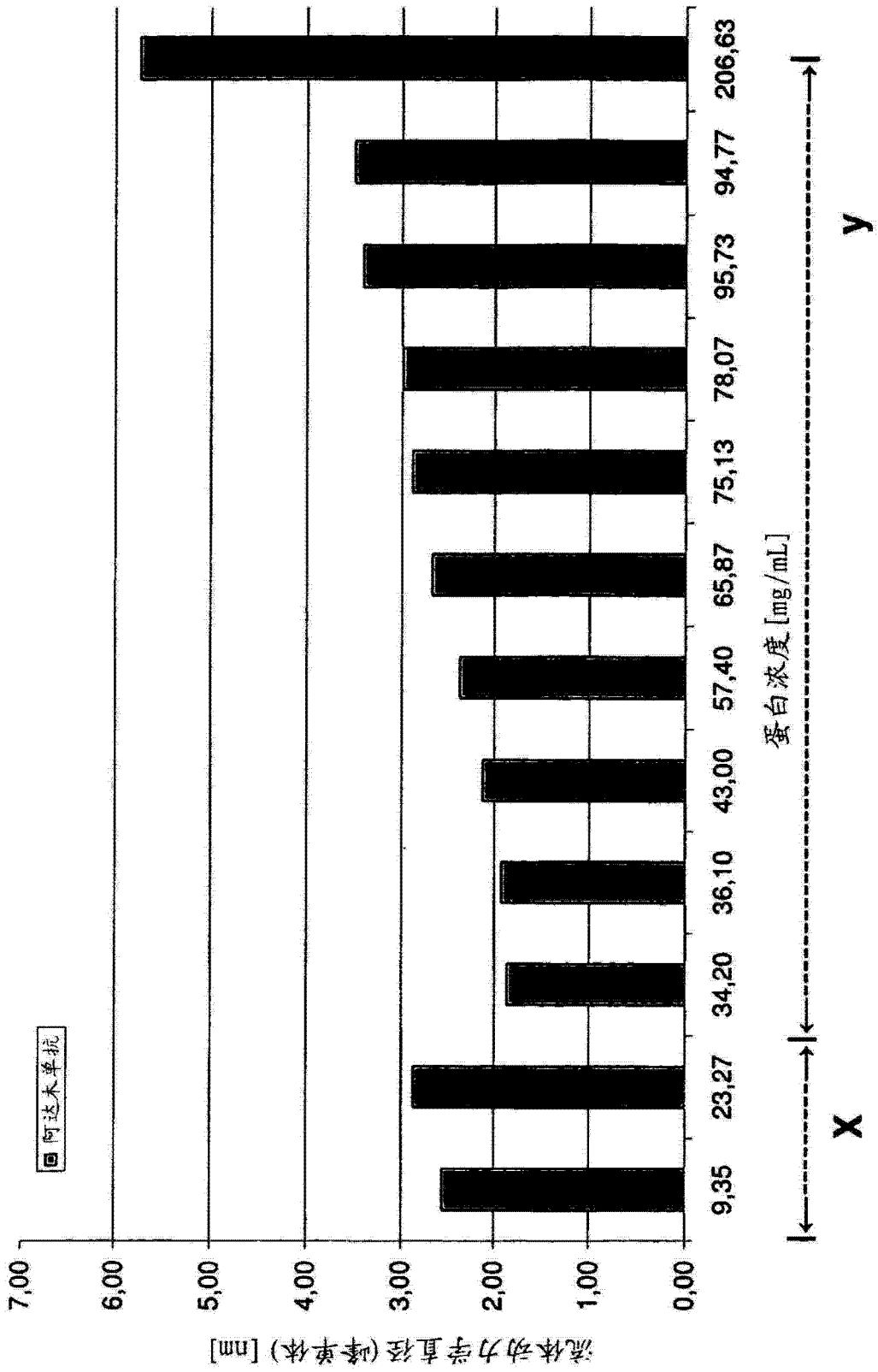


图 6

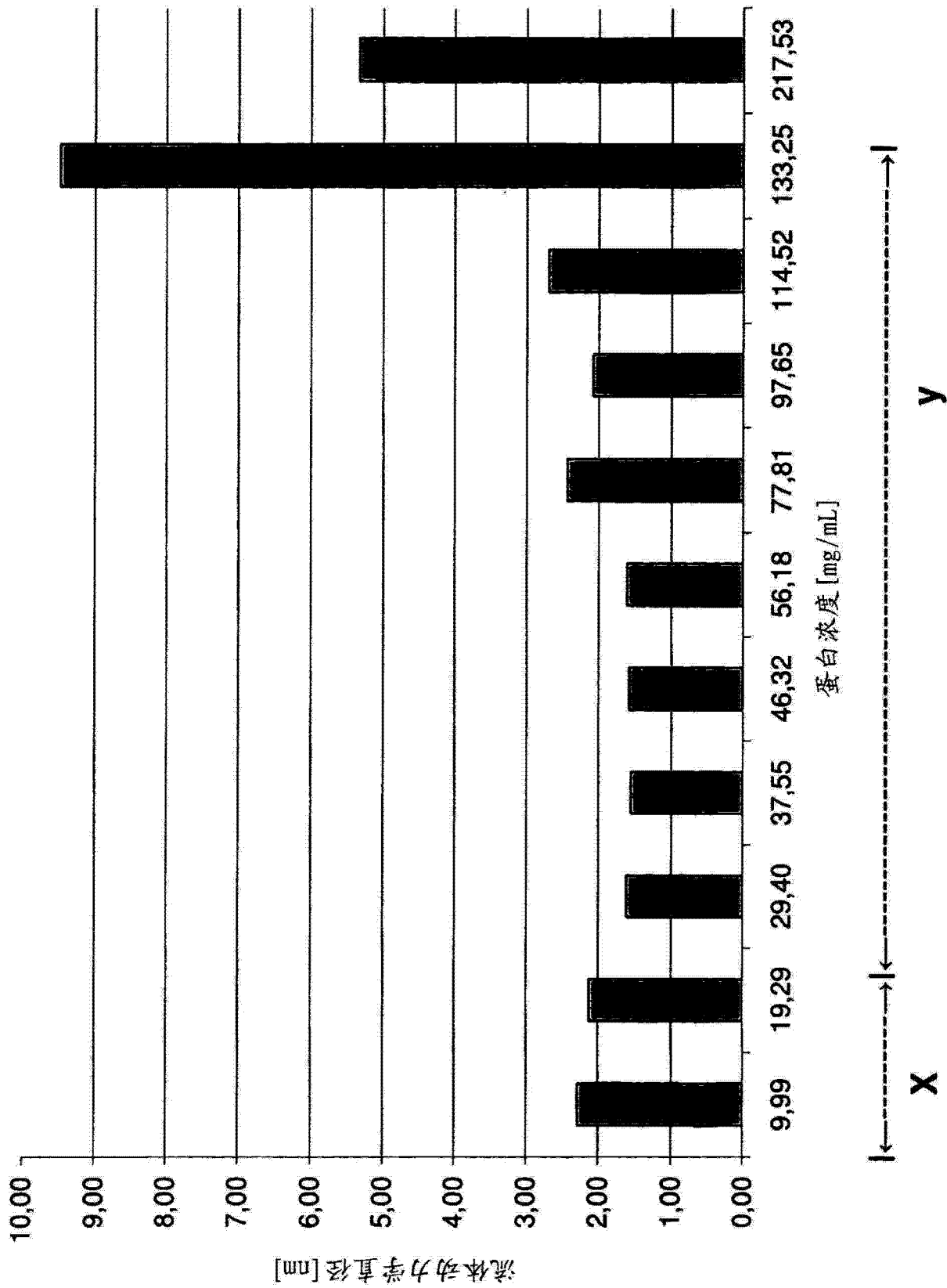


图 7

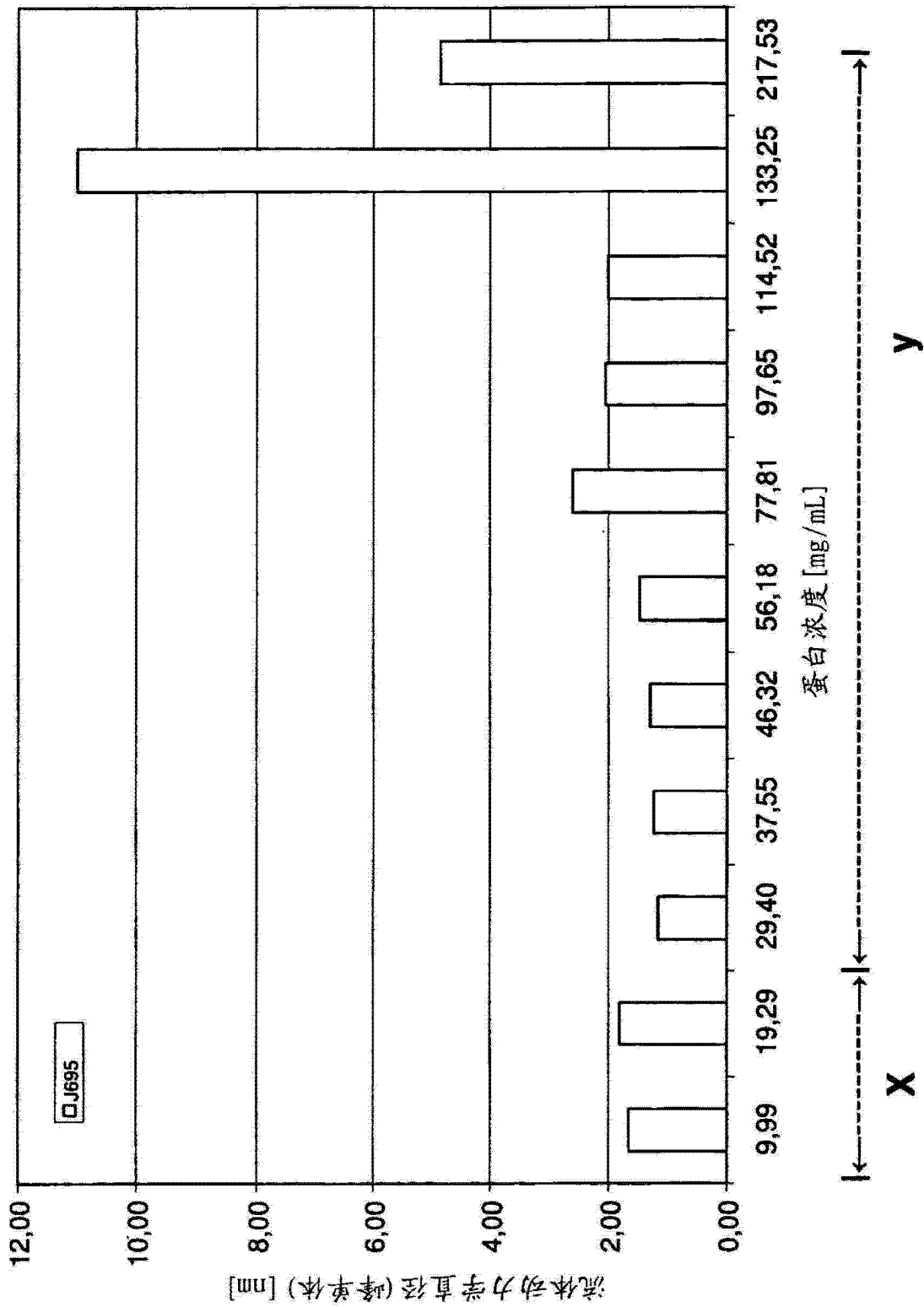


图 8

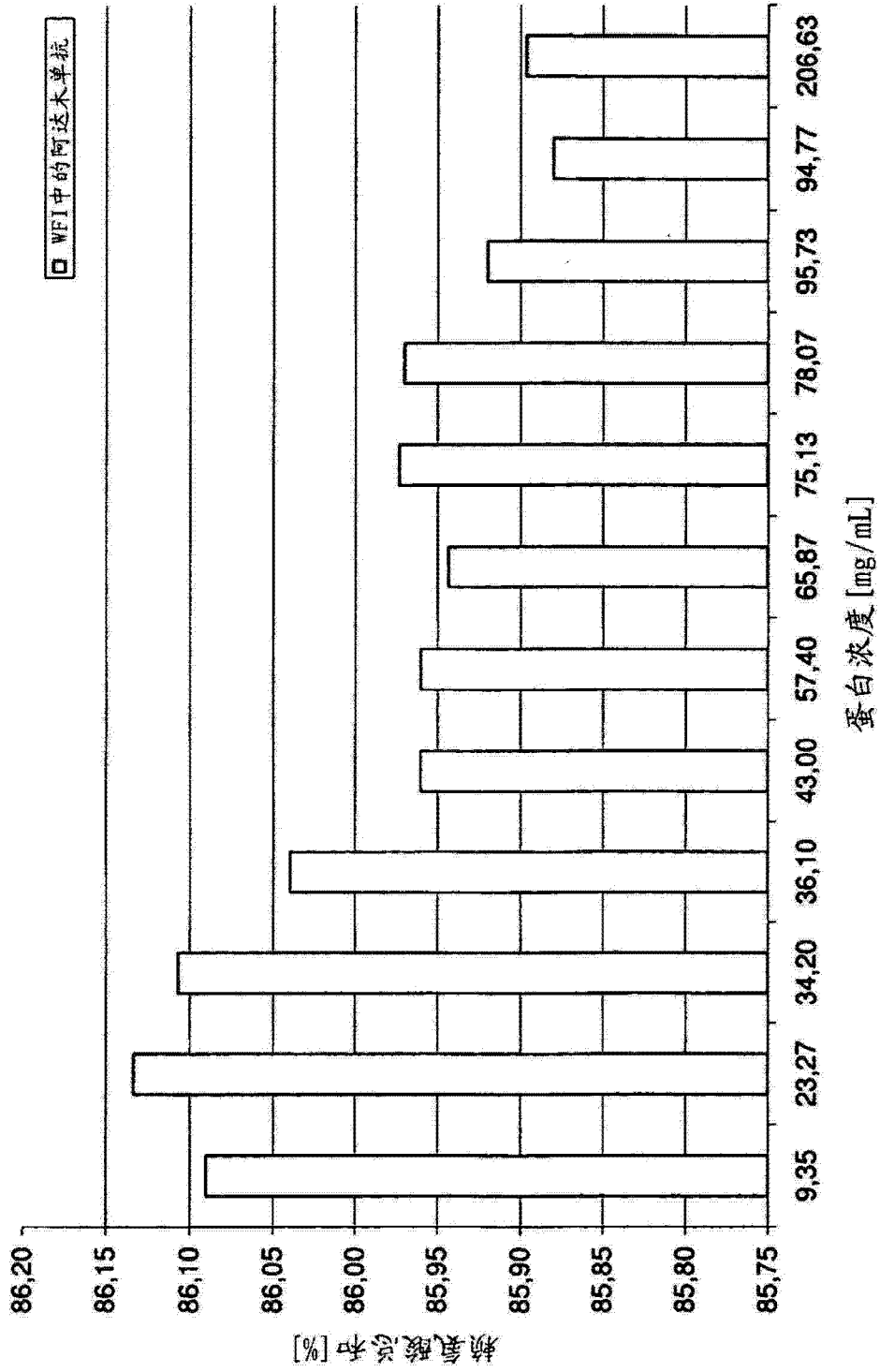


图 9

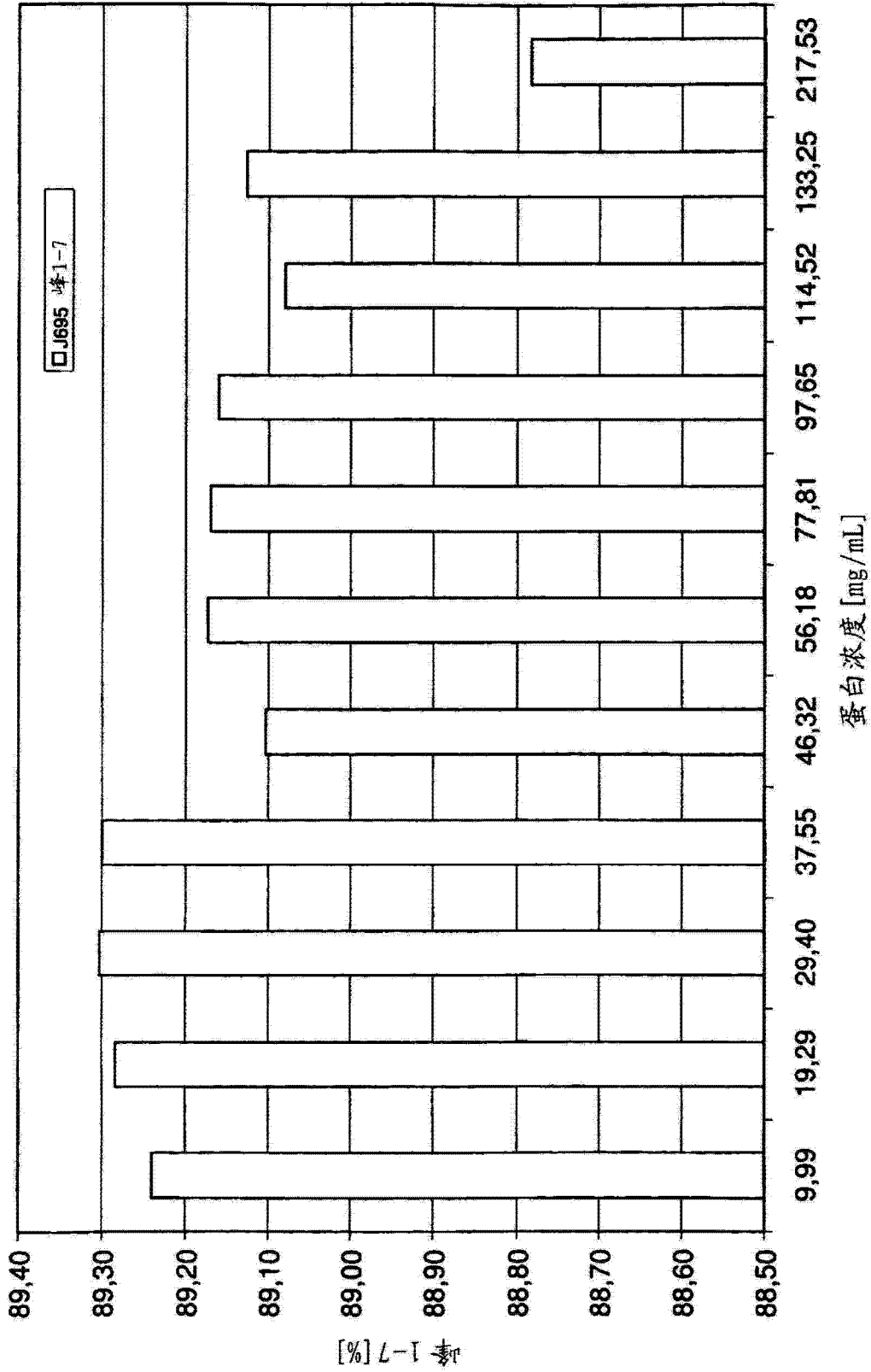


图 10

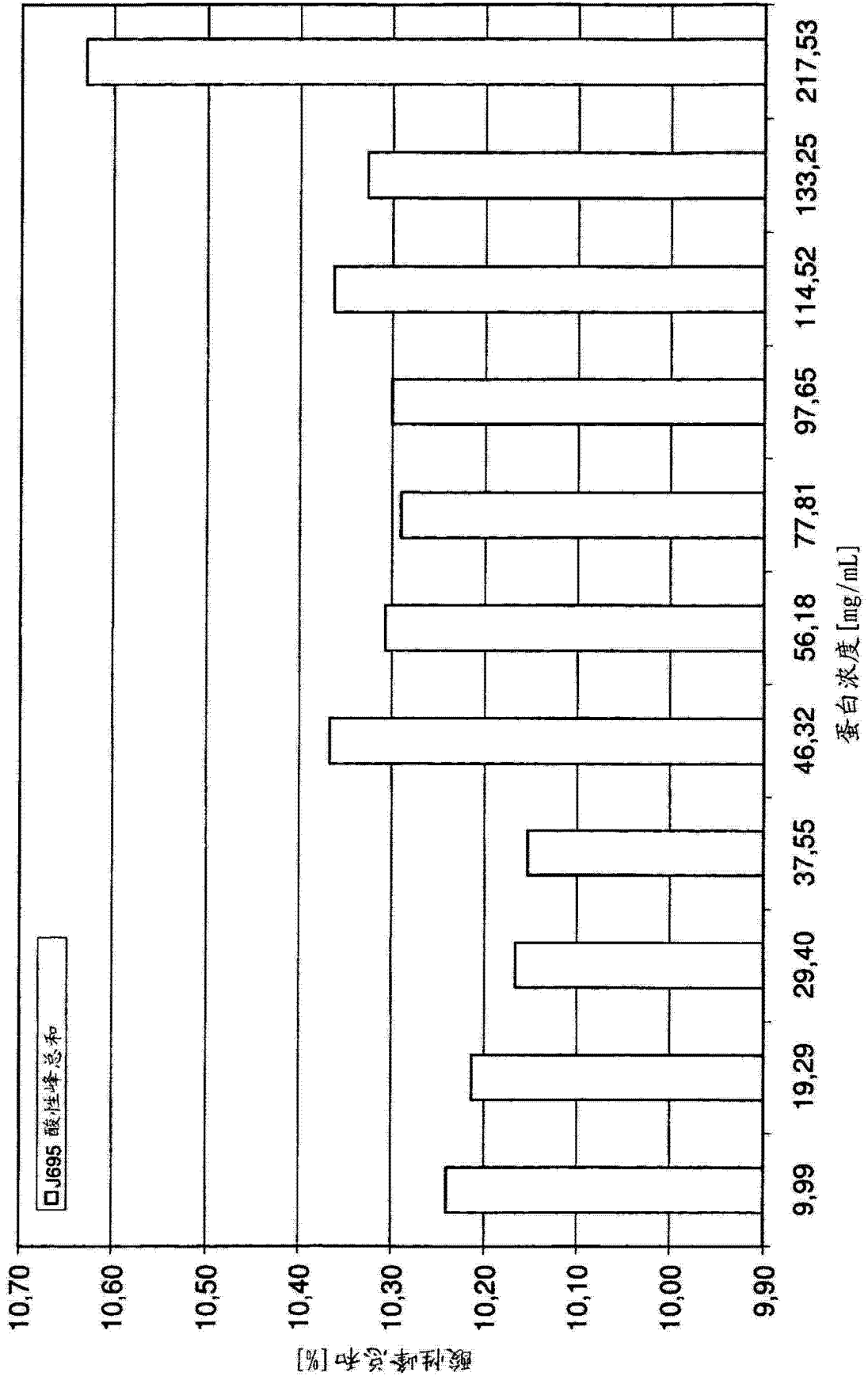


图 11

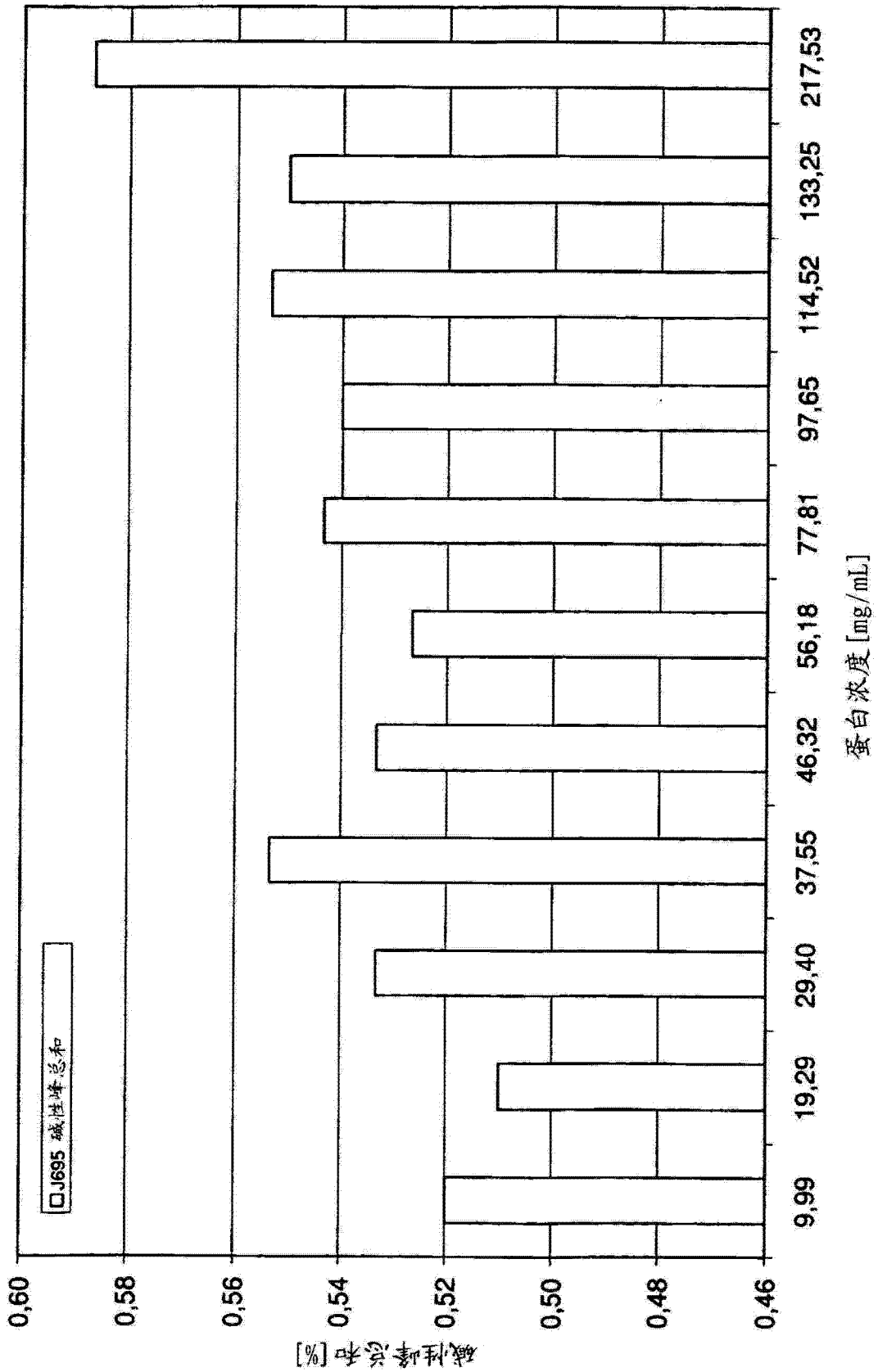
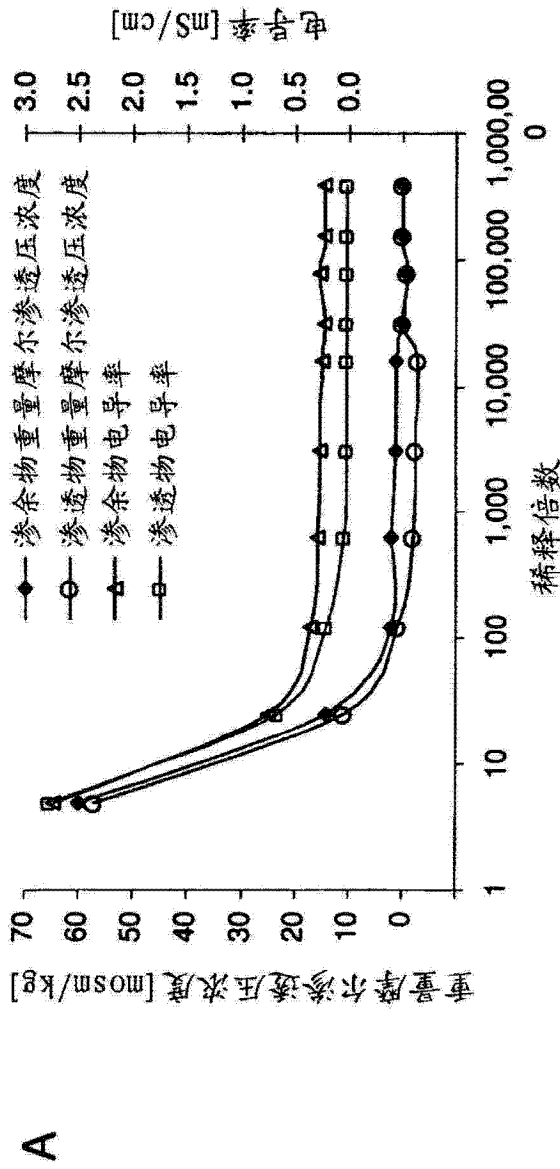


图 12



B

稀释/交换倍数	起始条件	5	25	125	625	3125	15625	31250	78125	156250	390625
渗透物 pH	5.26	5.37	5.35	5.35	5.36	5.40	5.44	5.56	5.44	5.58	5.62
渗透物重量摩尔渗透压浓度	305	60	14	2	2	1	1	0	-1	0	0
渗透物电导率	11.7	2.74	0.74	0.34	0.30	0.27	0.25	0.23	0.26	0.22	0.22
渗透物 pH	5.88	5.38	5.32	5.06	5.13	5.02	4.52	5.91	4.84	5.66	5.47
渗透物重量摩尔渗透压浓度	1.0	57.0	10.8	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
渗透物电导率	0.01	2.77	0.66	0.19	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02

图 13

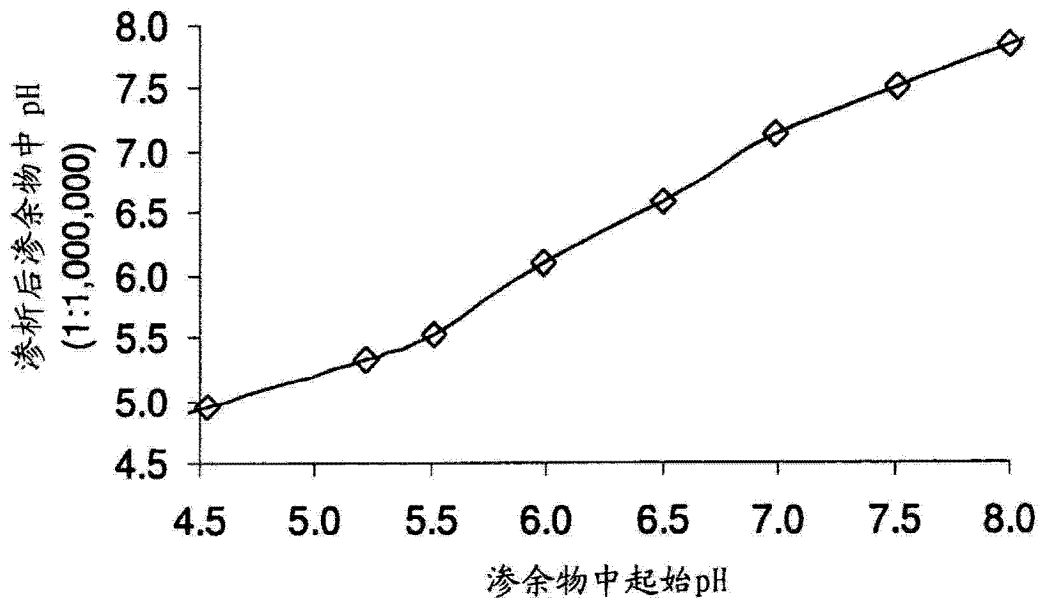


图 14

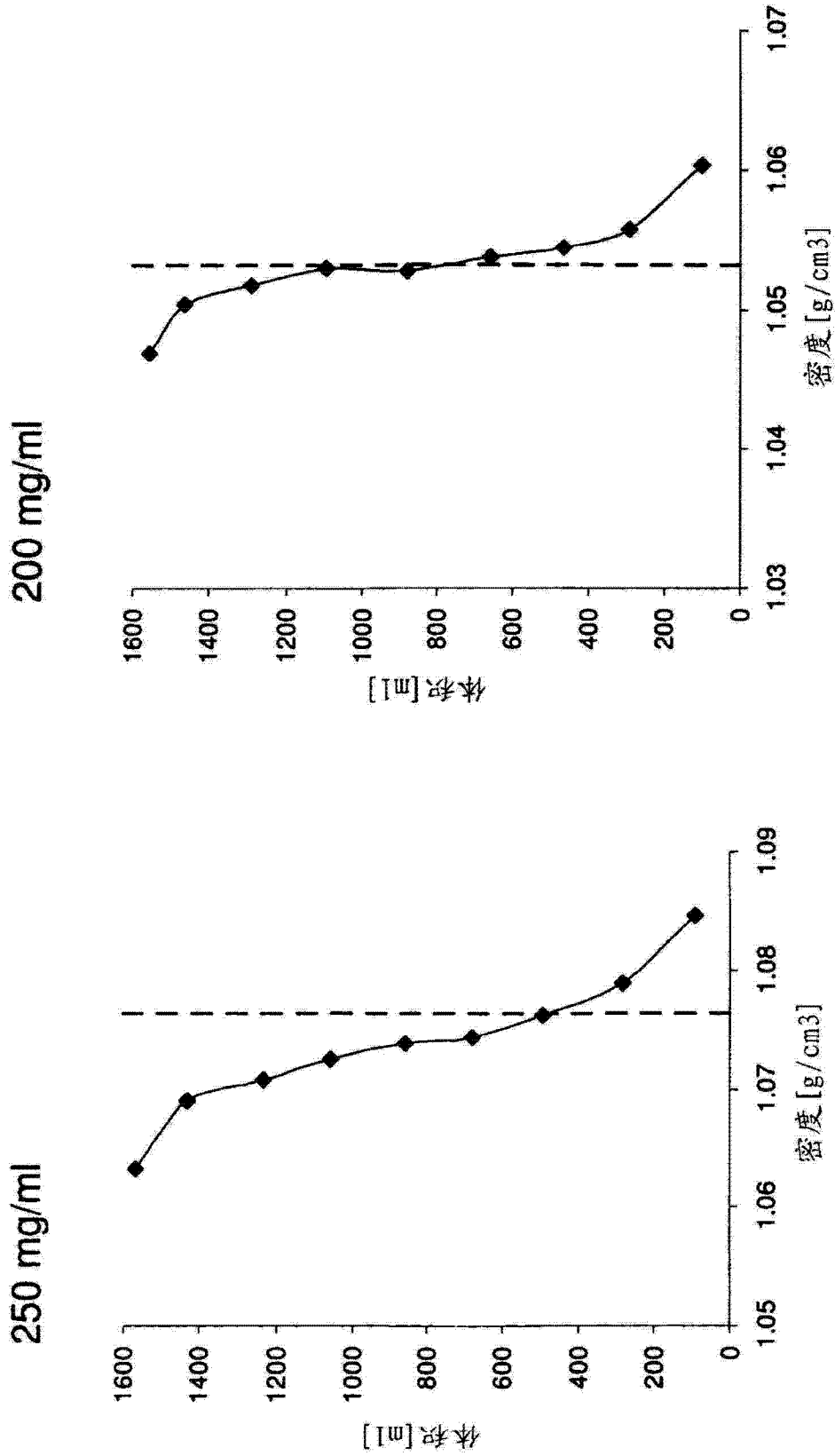


图 15

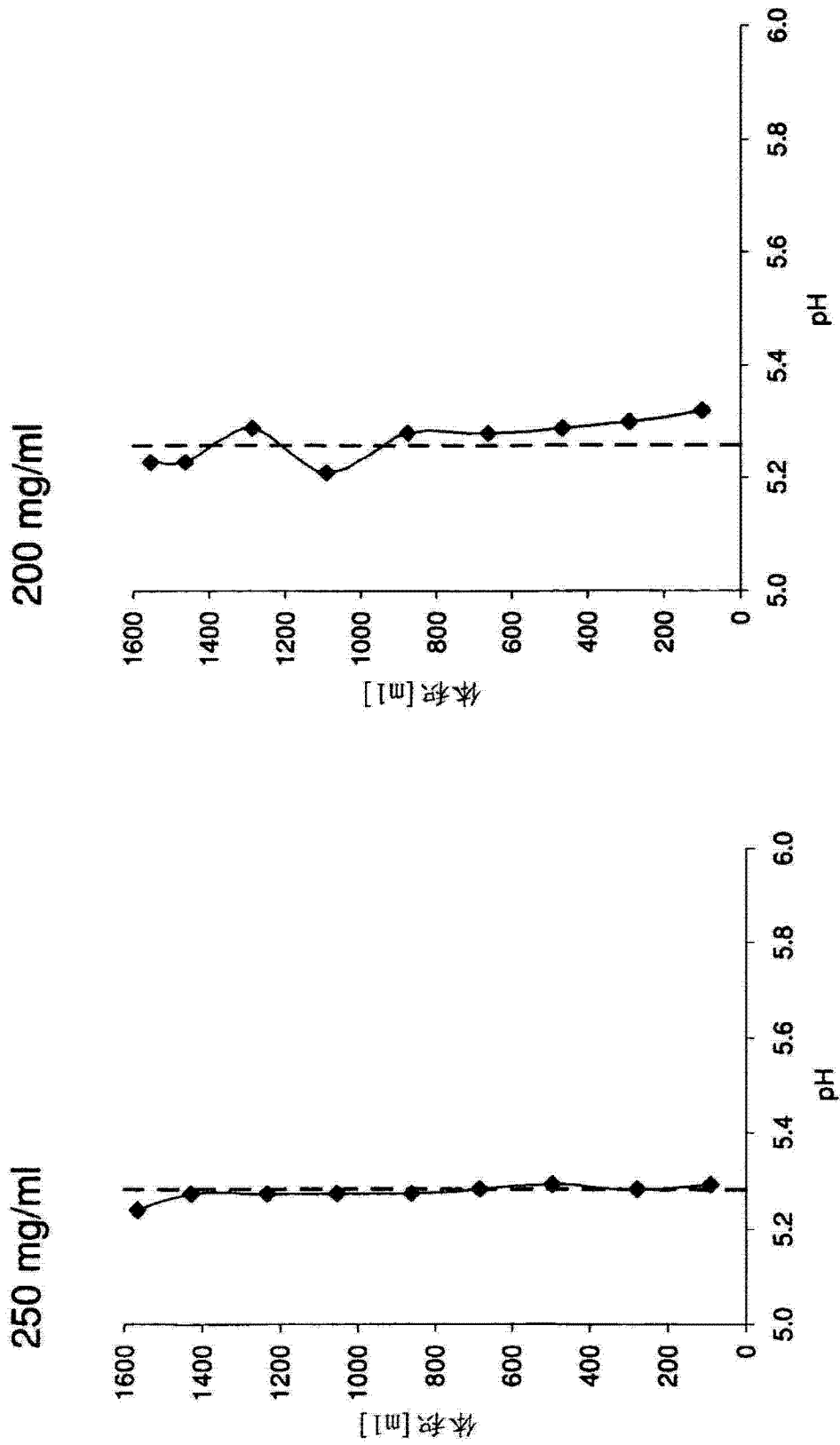


图 16

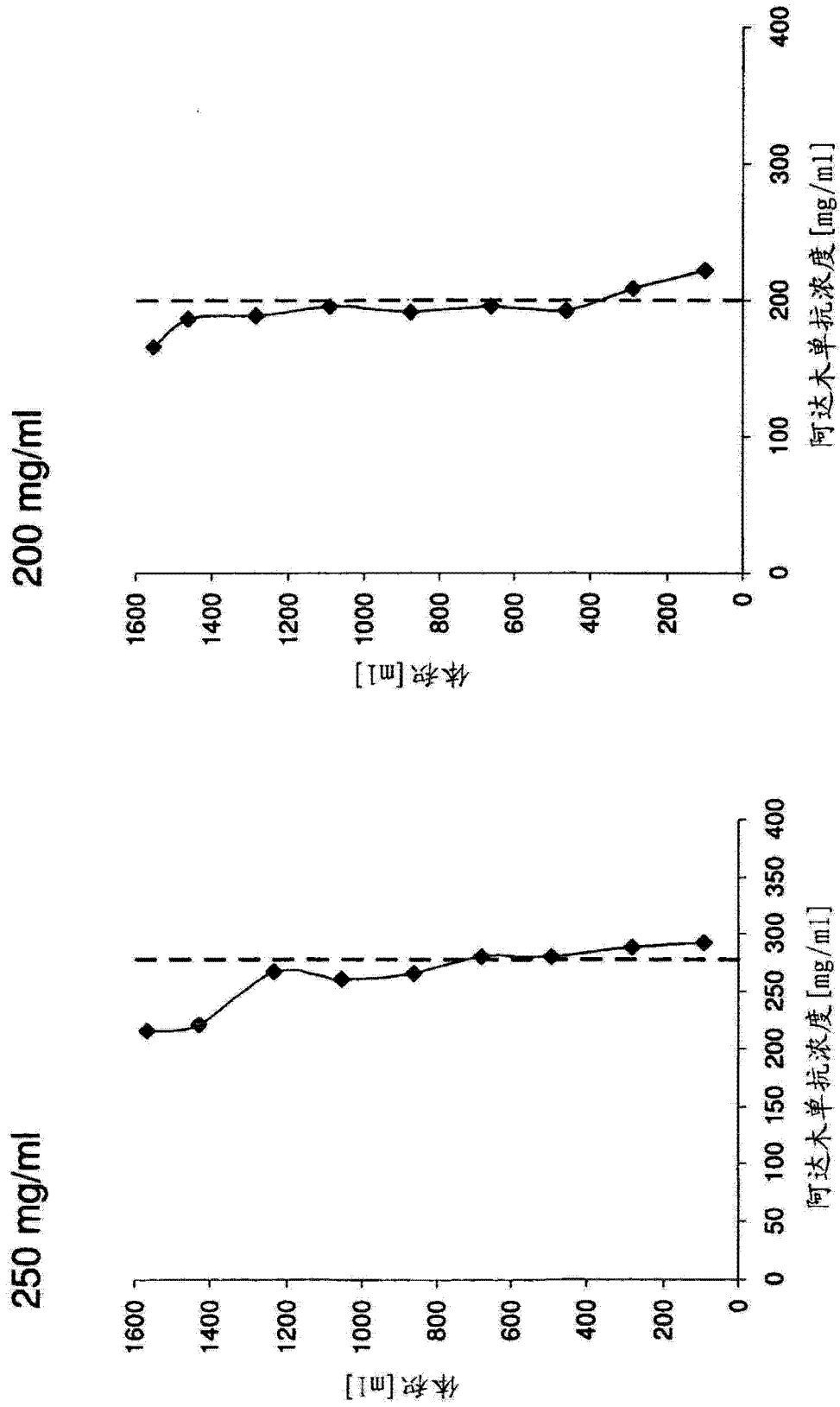


图 17

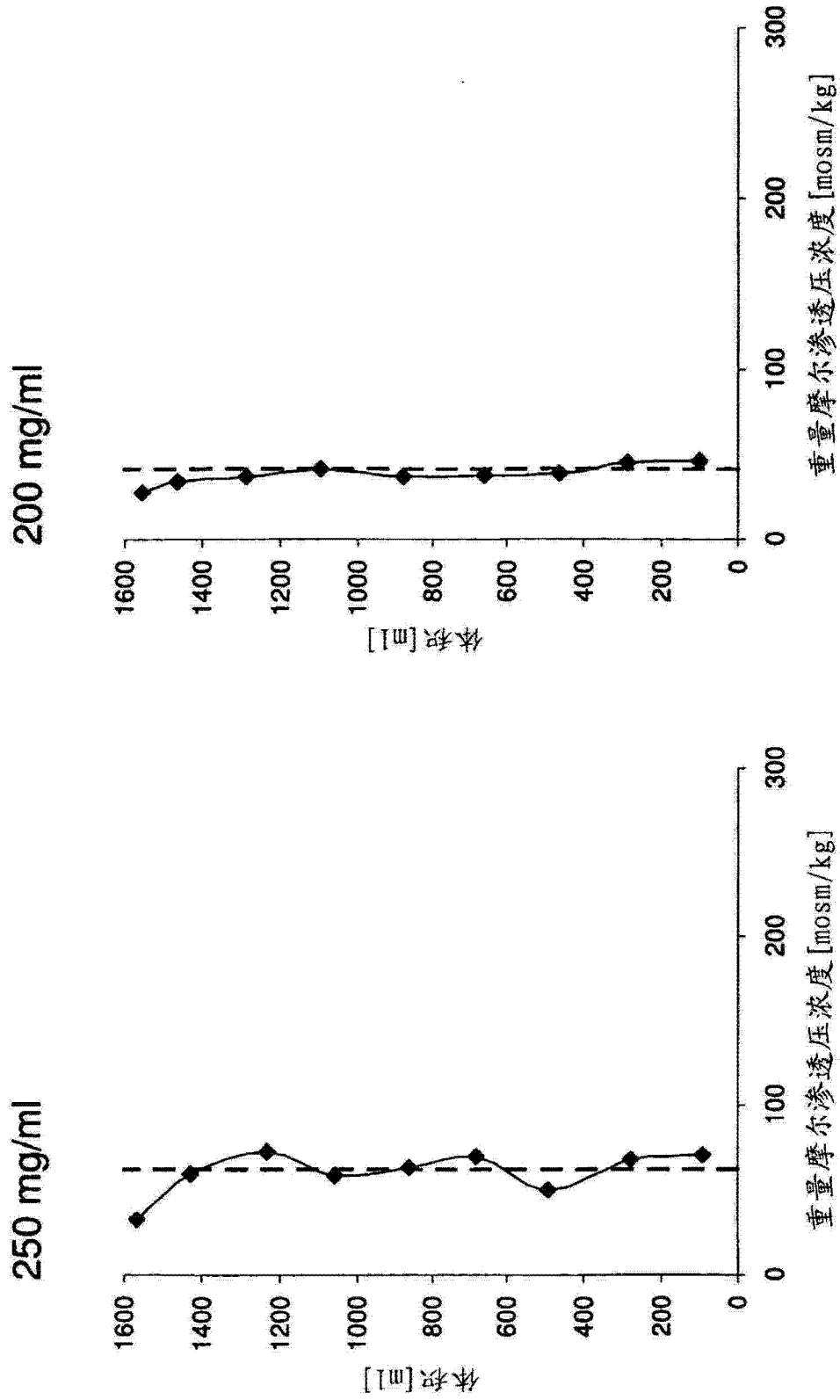


图 18

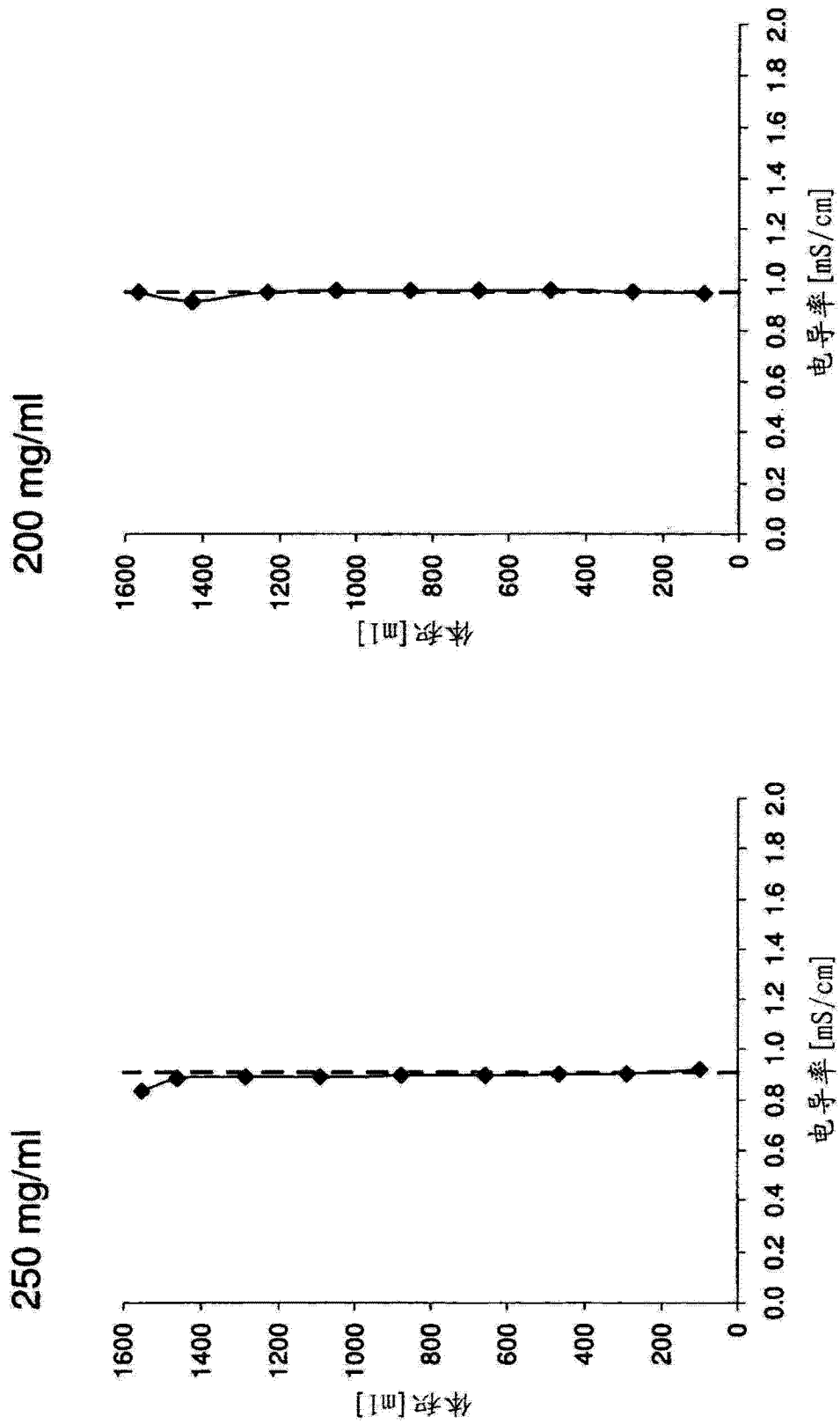


图 19

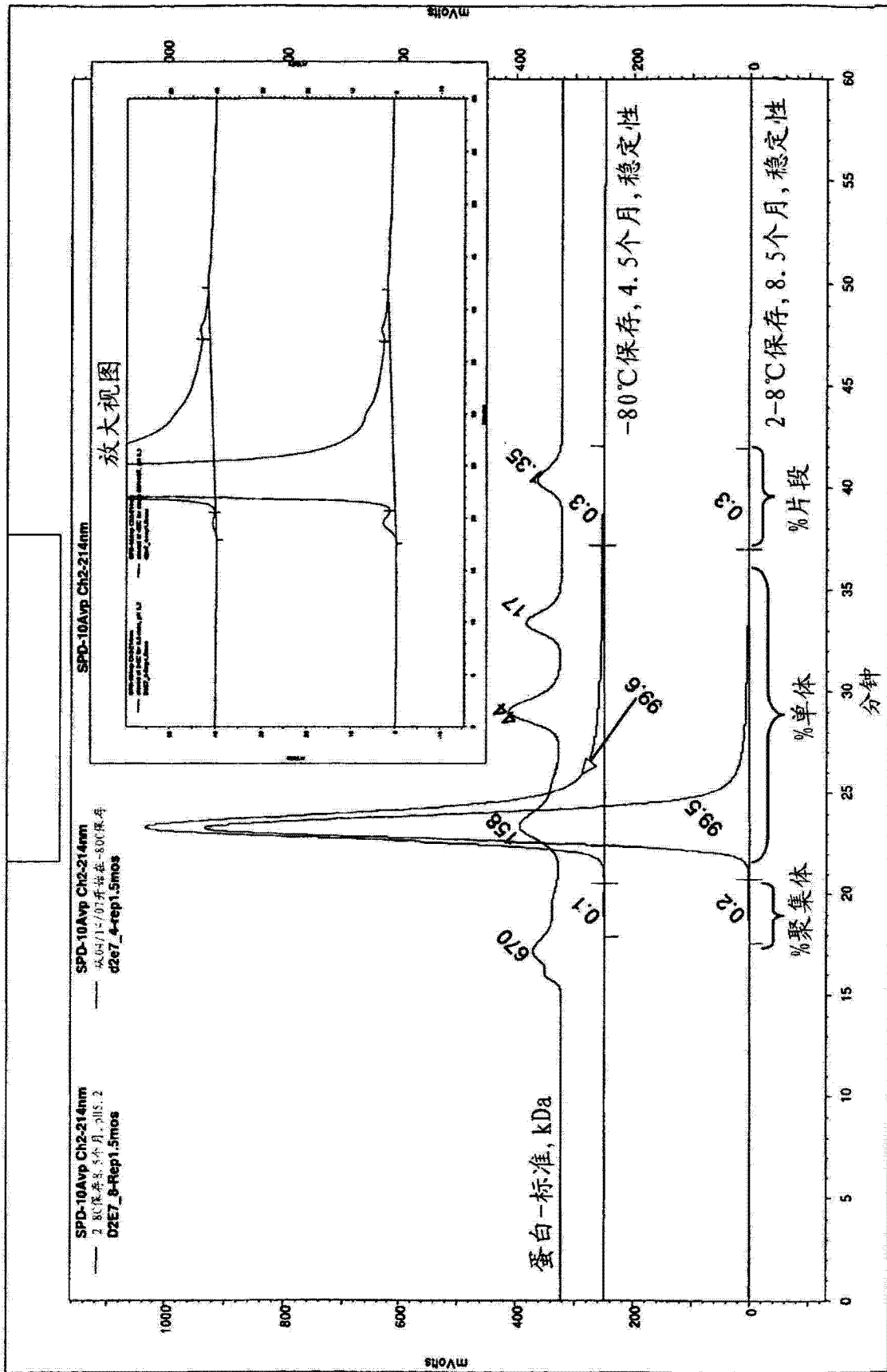


图 20

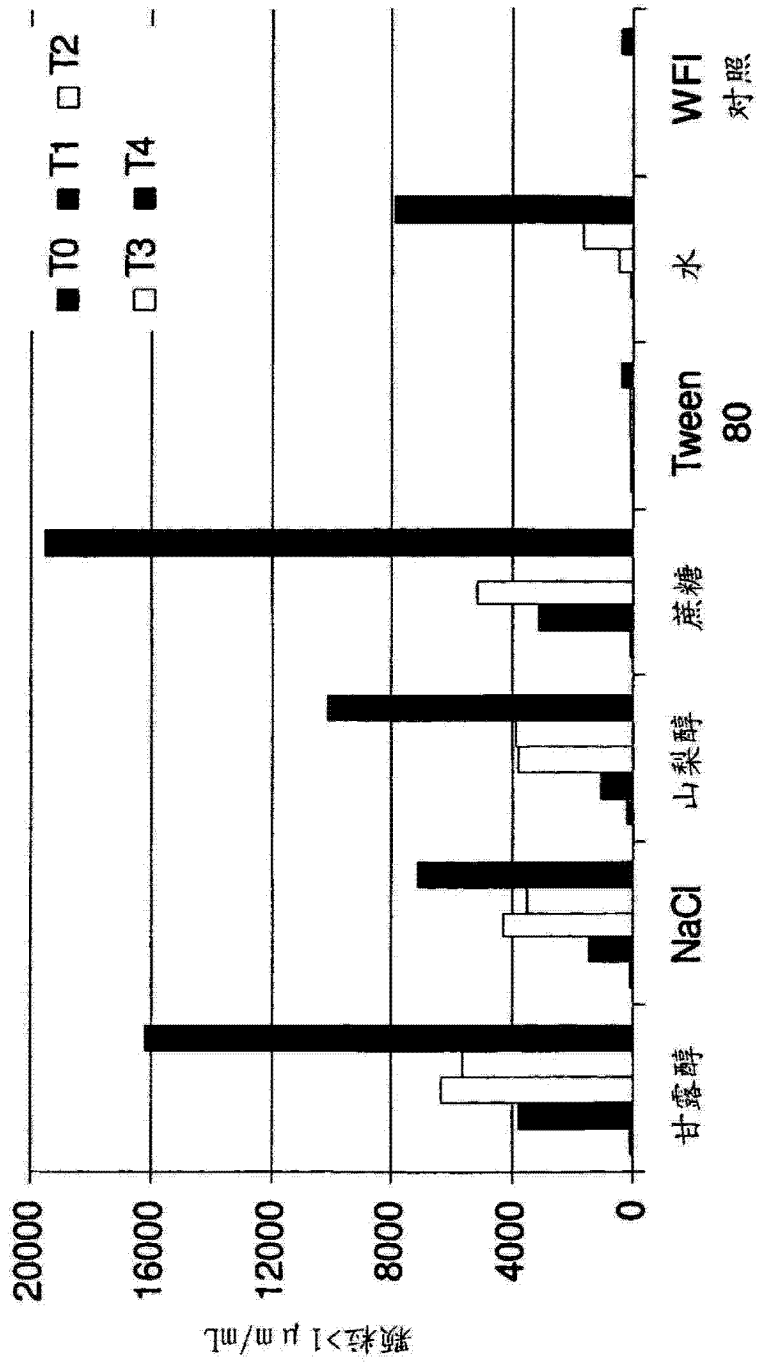


图 21

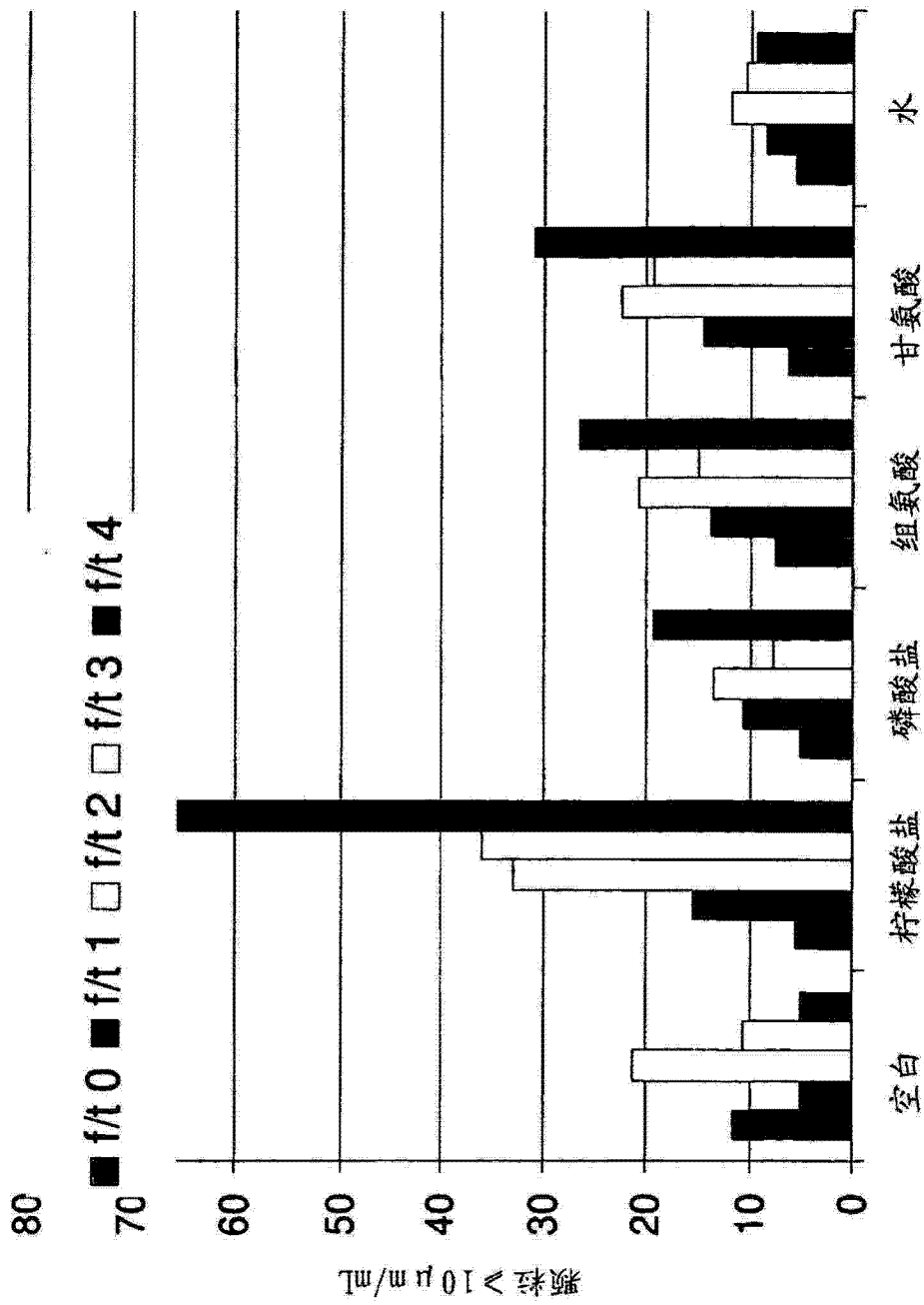


图 22

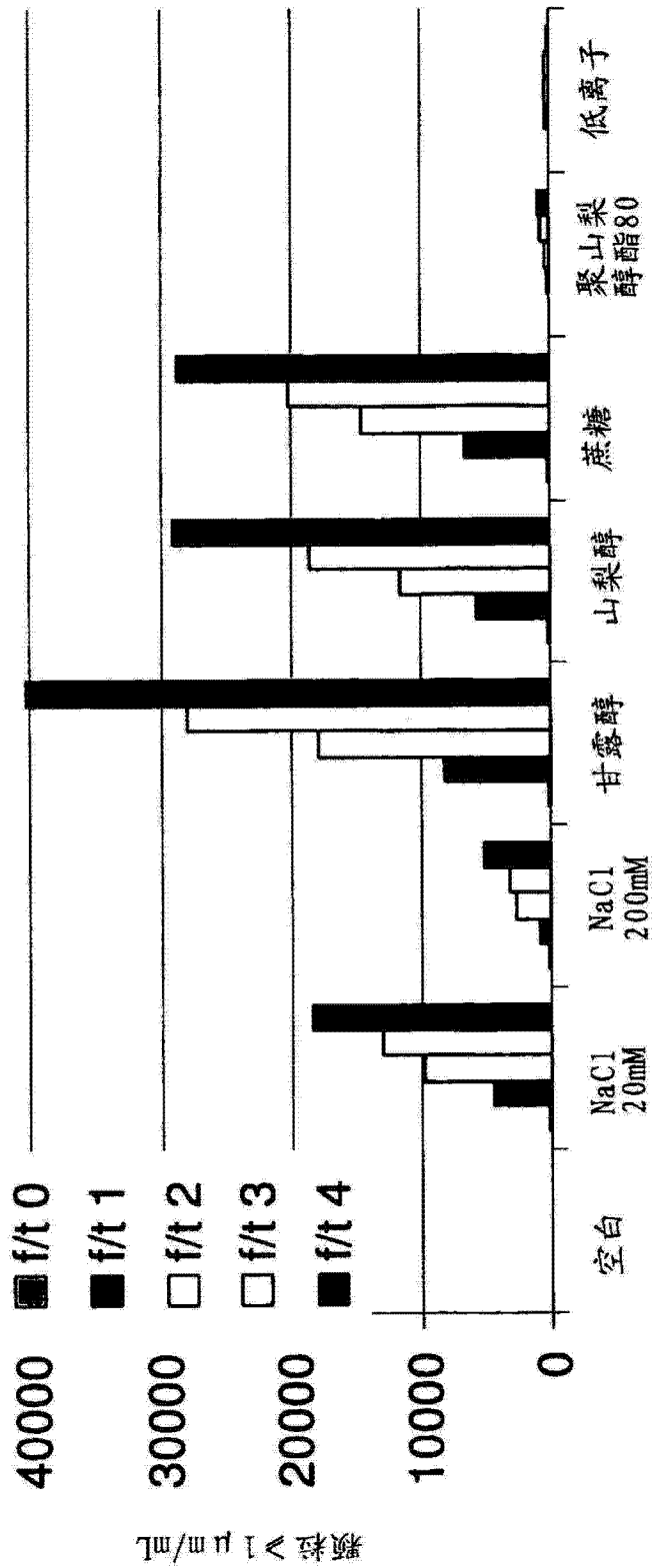


图 23

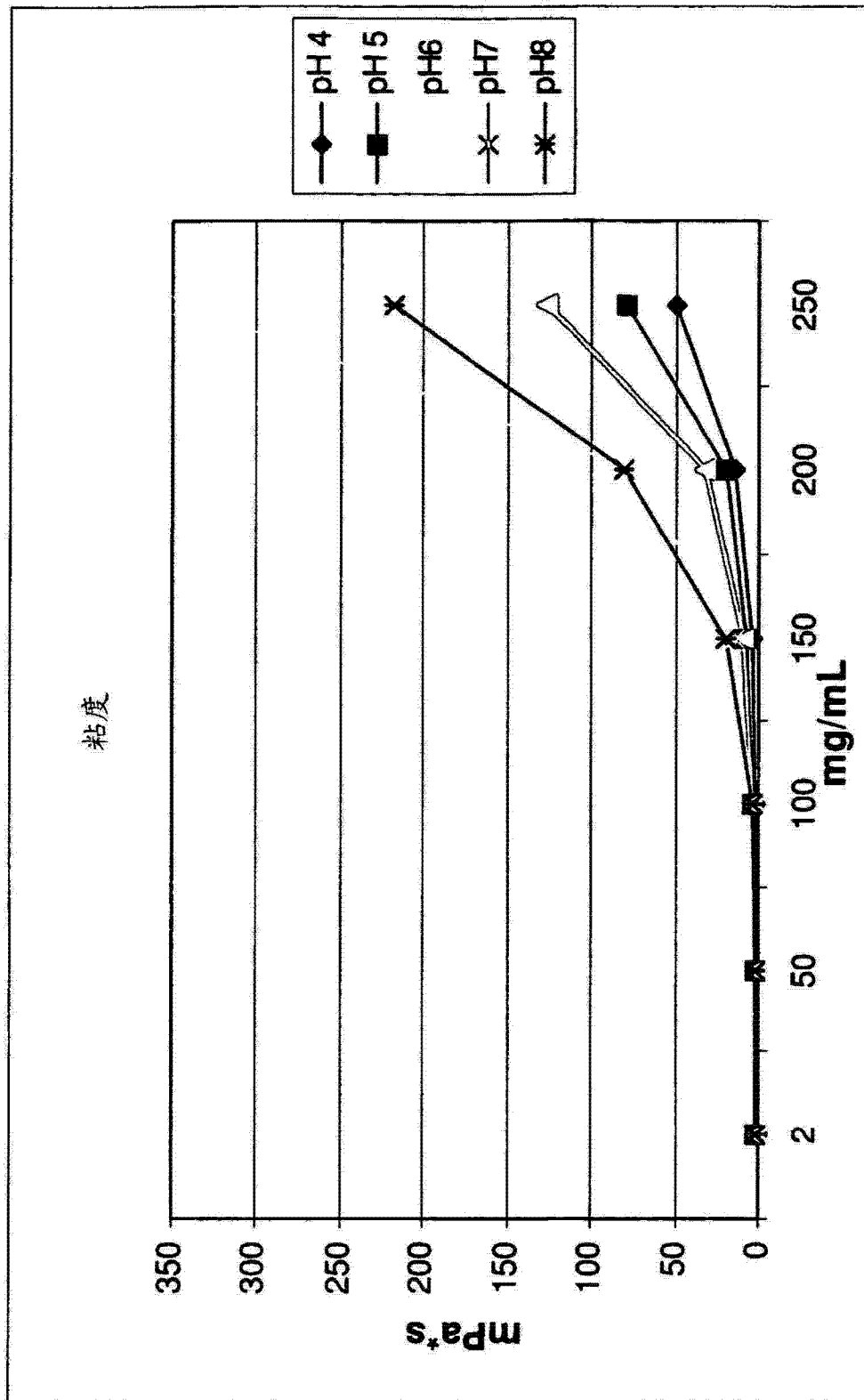


图 24

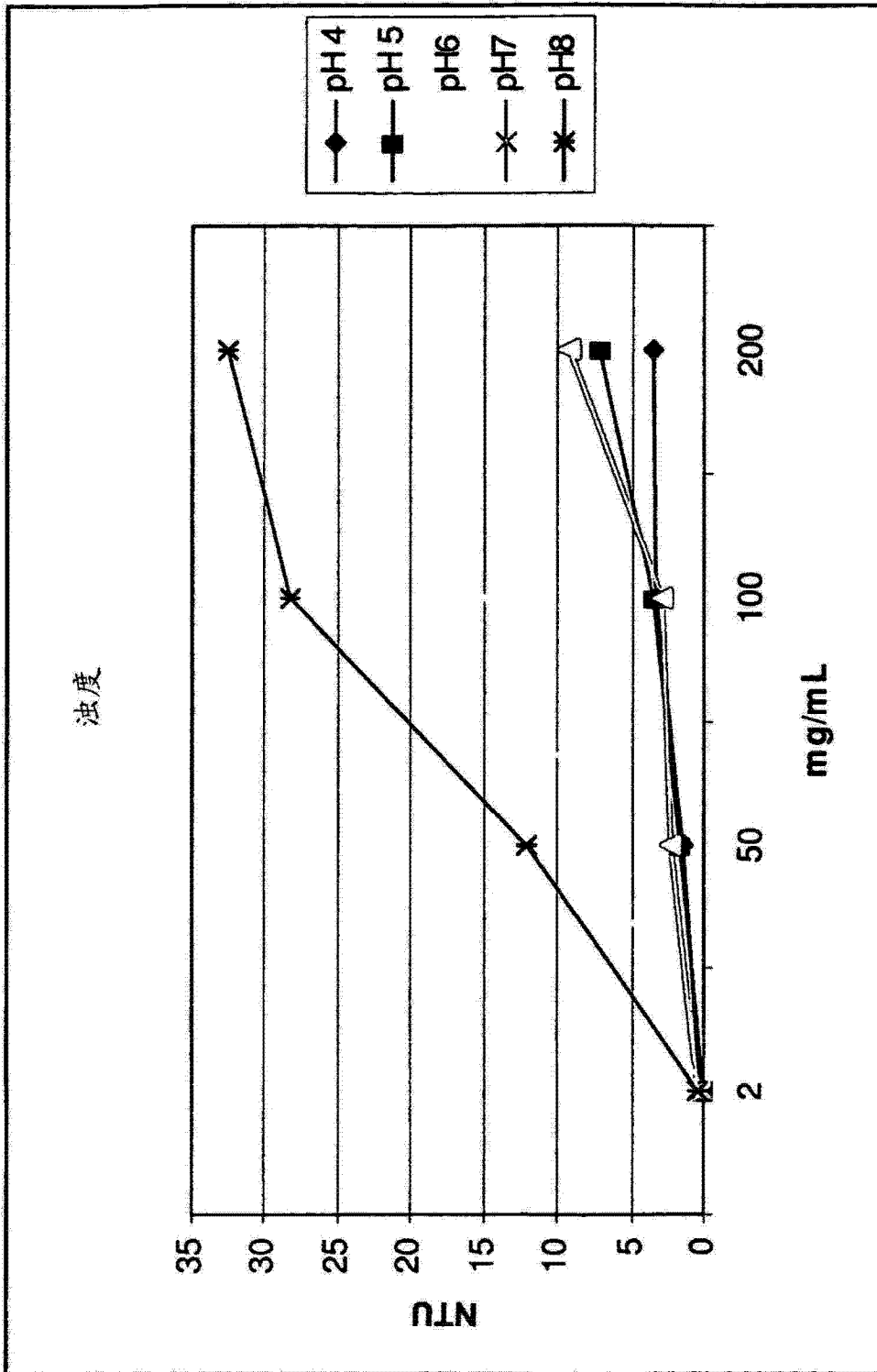


图 25

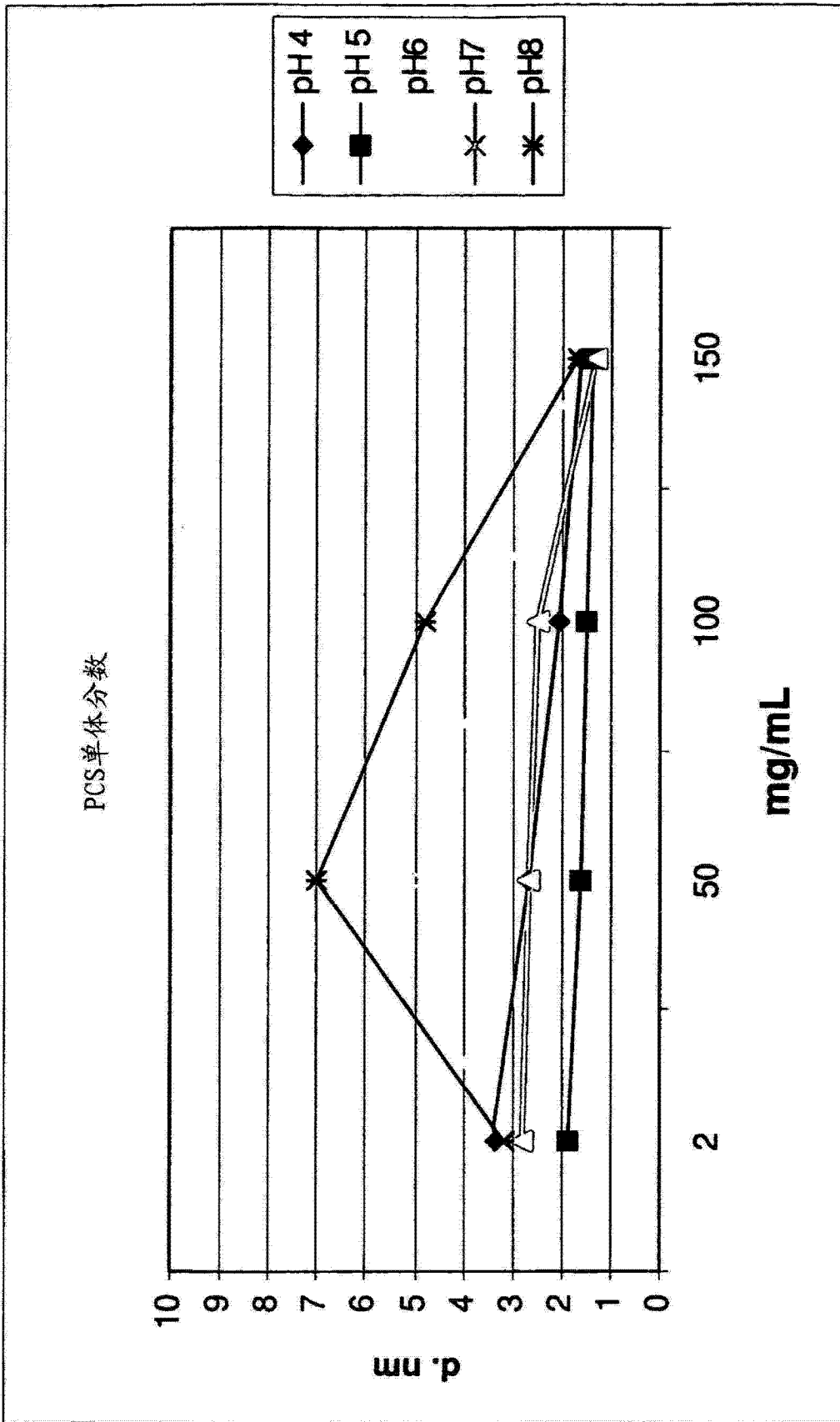


图 26

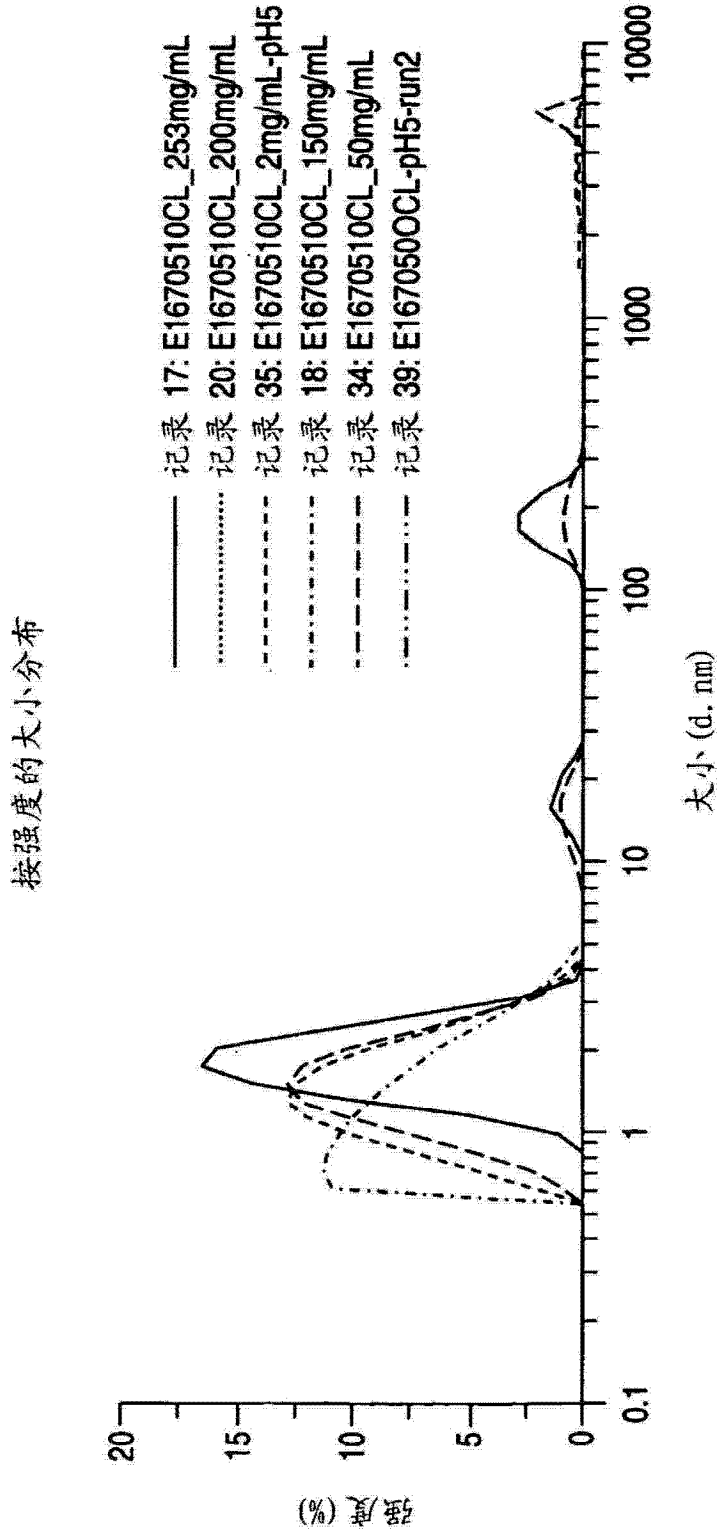


图 27

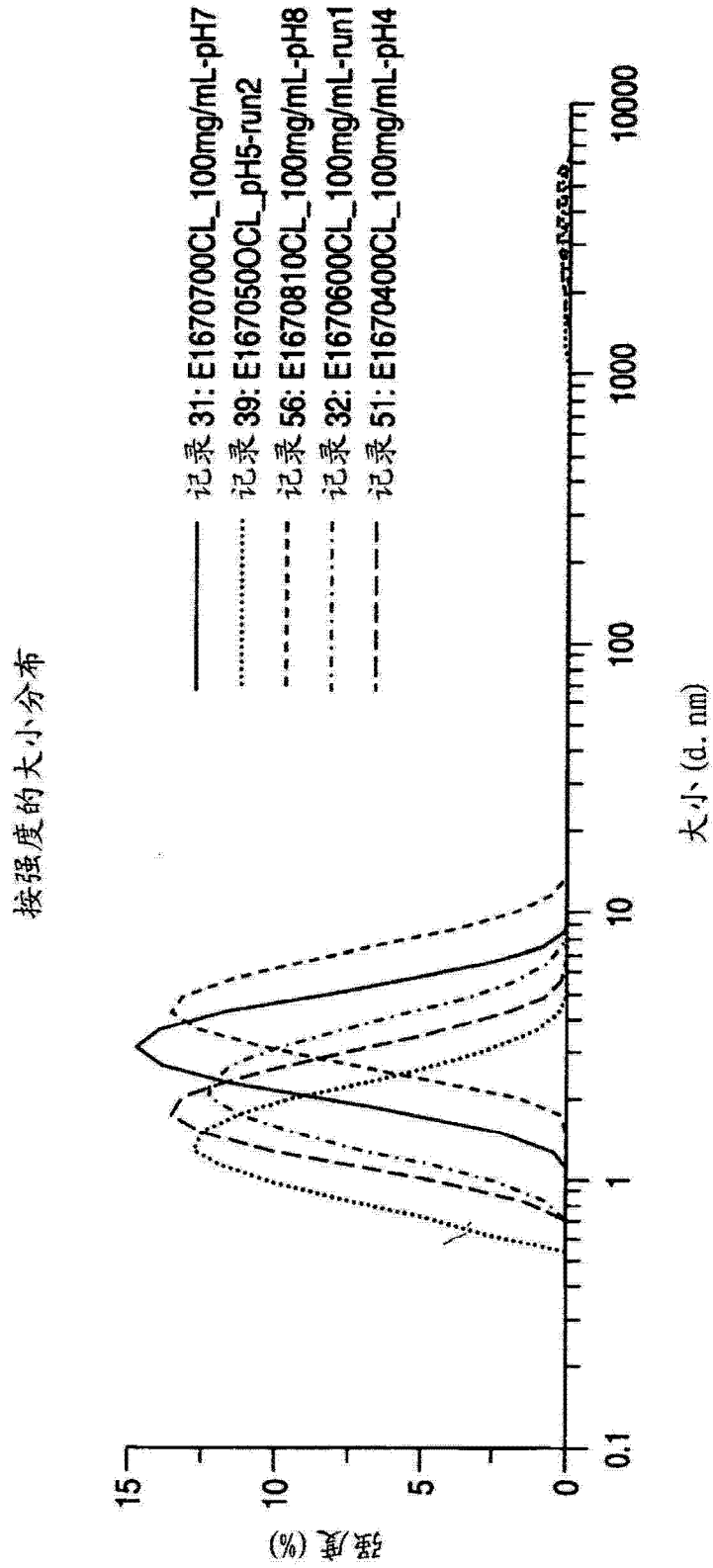


图 28

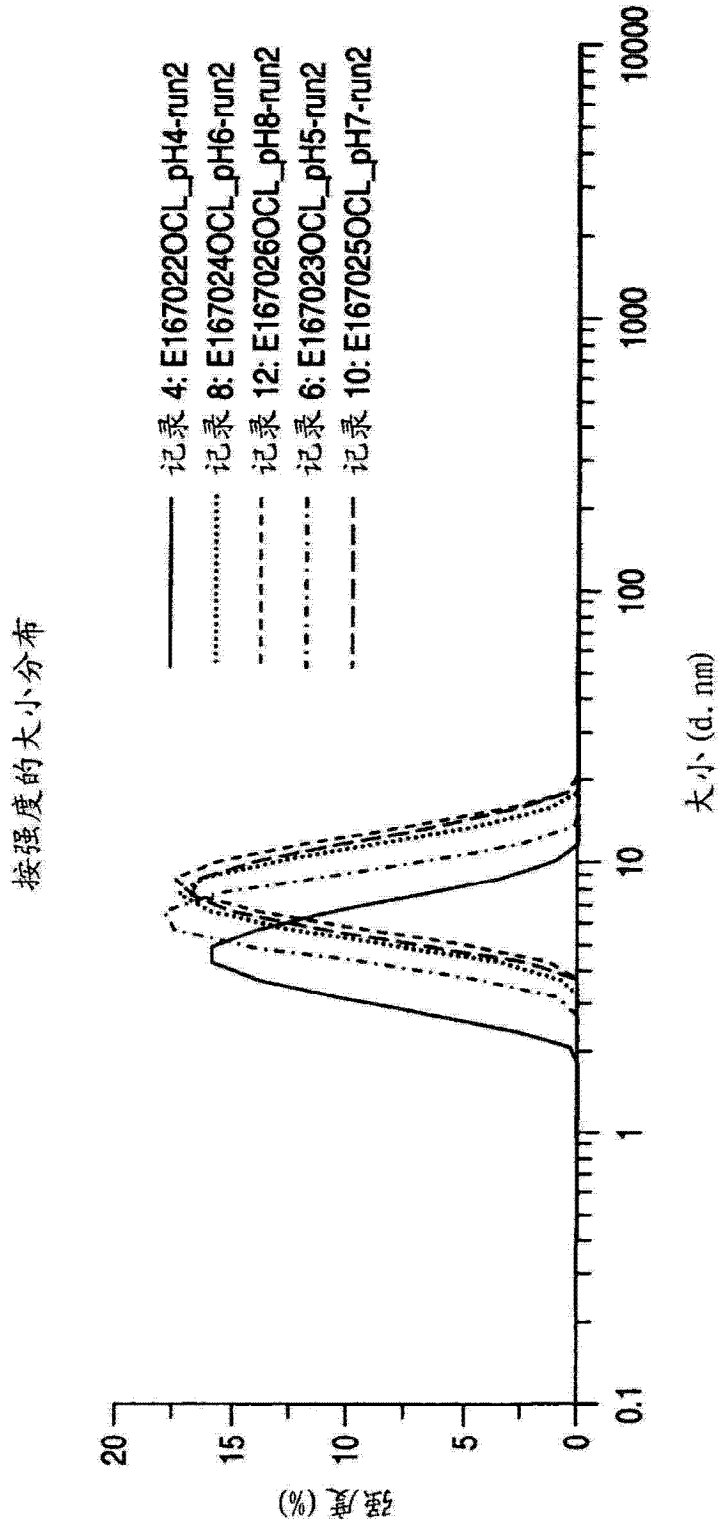


图 29

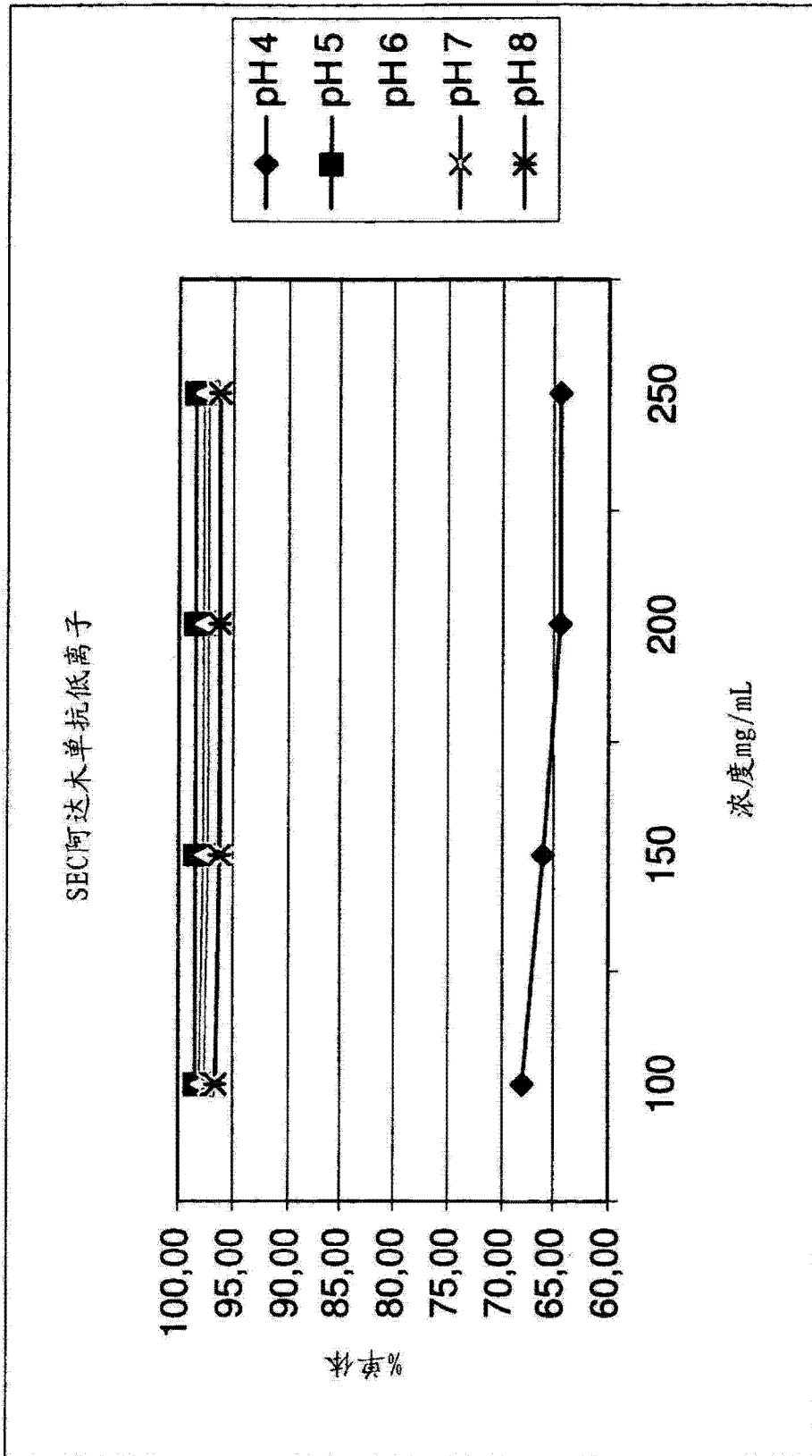


图 30

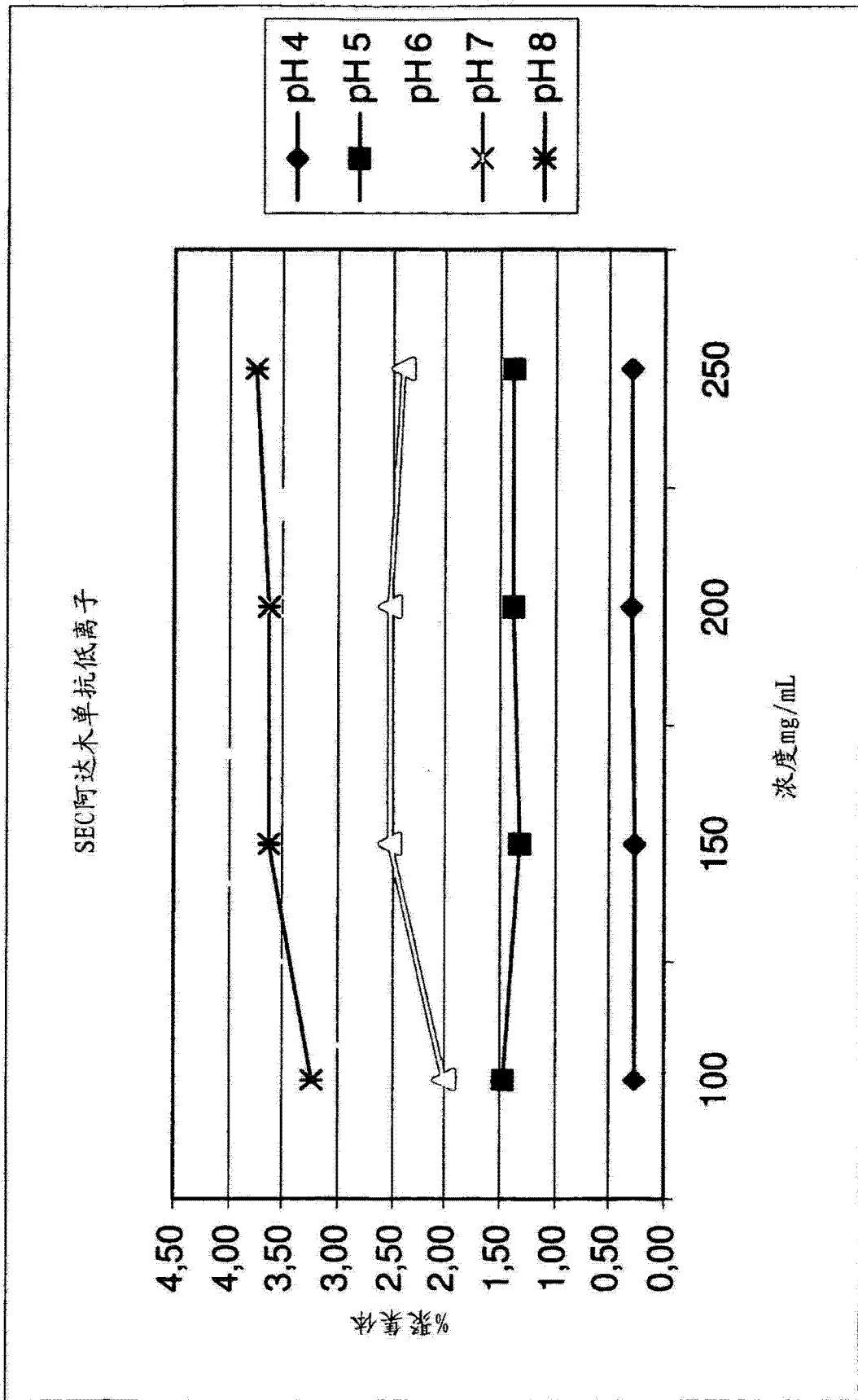


图 31

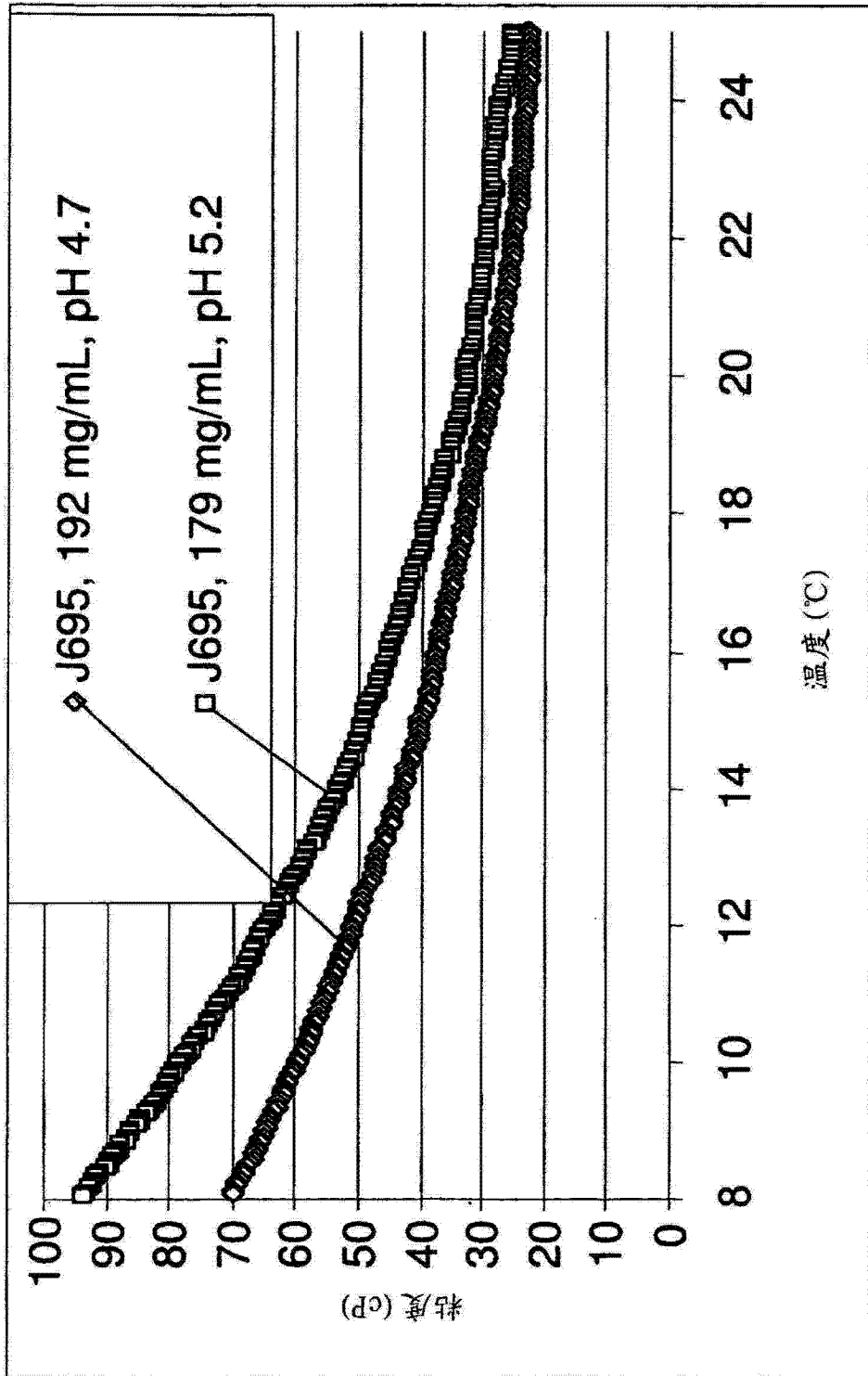


图 32

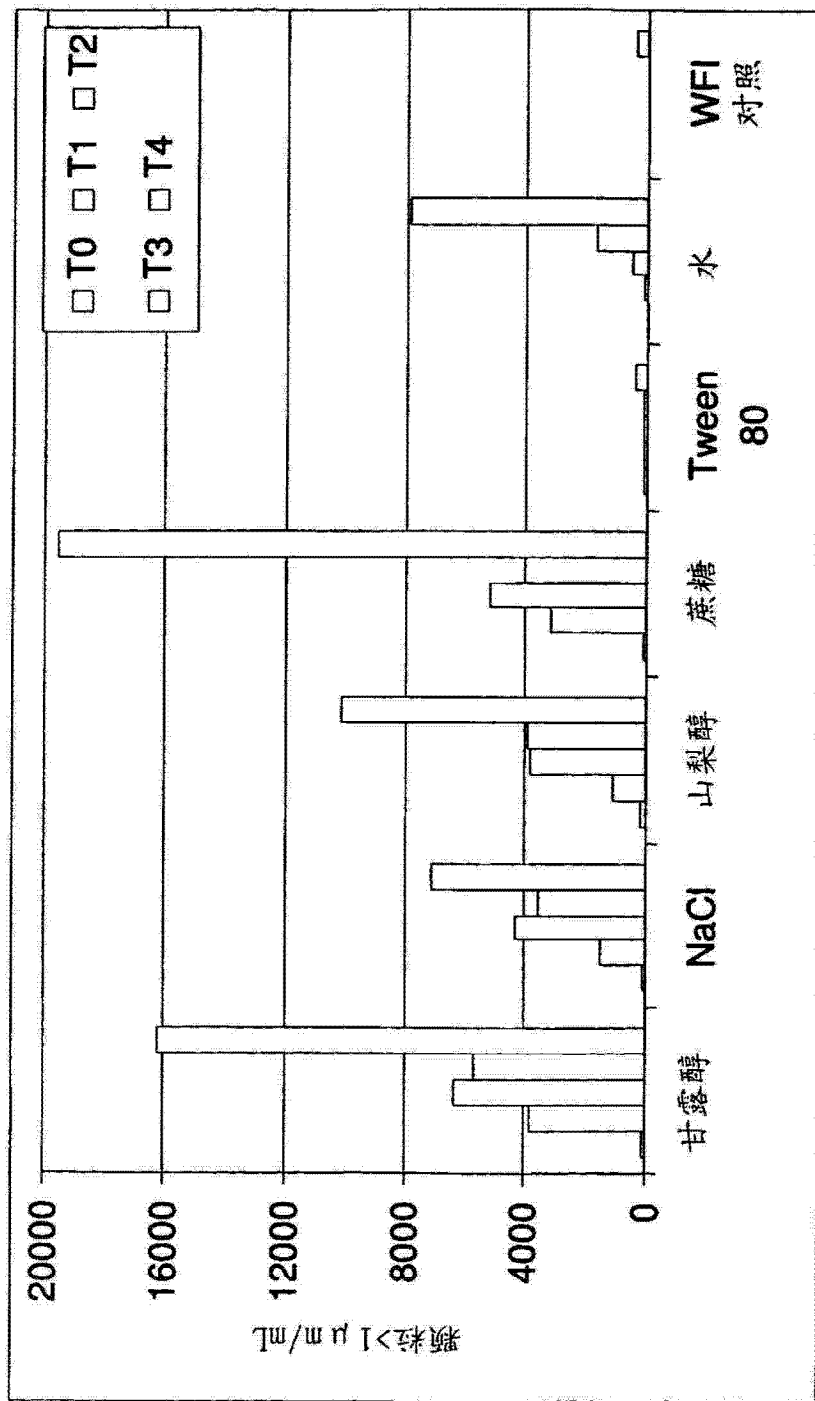


图 33

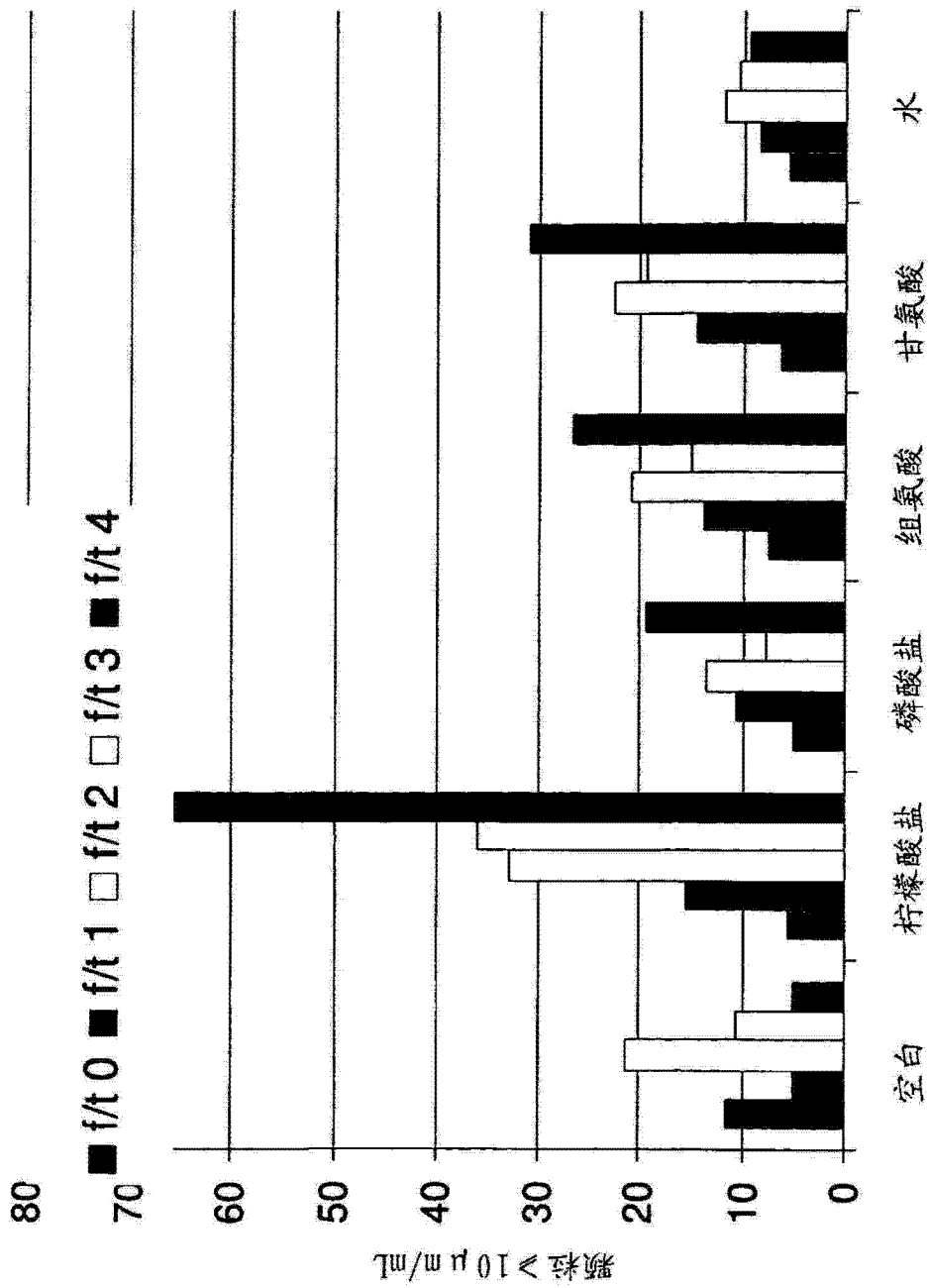


图 34

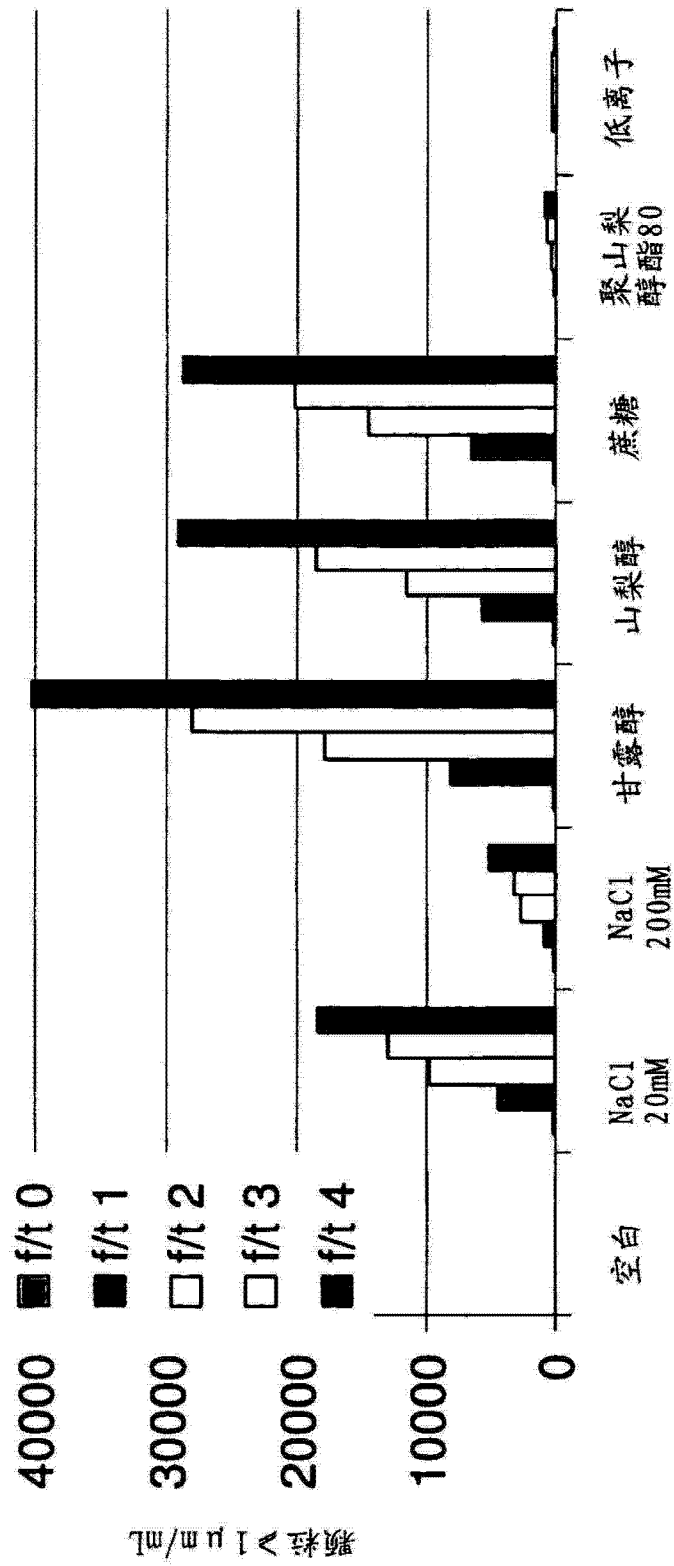


图 35

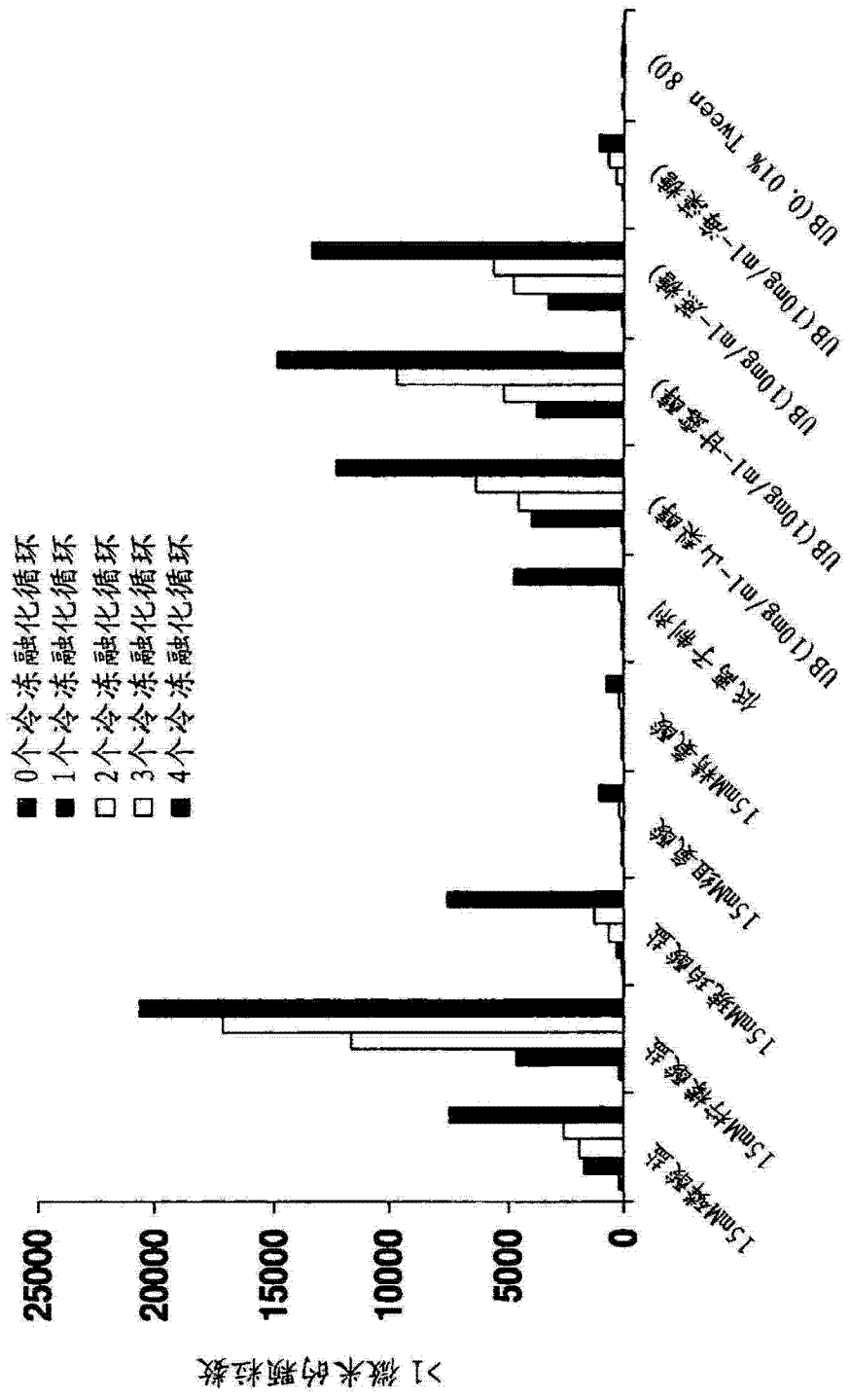


图 36